



**César Rafael  
Marques Tavares**

**Desenvolvimento e validação de um método  
analítico para a quantificação multielementar em  
cabelo humano por ICP no LCA**





**César Rafael  
Marques Tavares**

**Desenvolvimento e validação de um método analítico  
para a quantificação multielementar em cabelo  
humano por ICP no LCA**

Relatório de estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química – ramo de Química Analítica e Qualidade, realizado sob a orientação científica da Dr.<sup>a</sup> Joana Miguel Sarmento Castelhana Dias Coimbra, Coordenadora da Qualidade do Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro, e da Dr.<sup>a</sup> Maria da Eduarda da Cunha Pereira, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho aos meus pais, pelos seus esforços para me proporcionarem as condições necessárias para concluir um curso do ensino superior, à minha irmã e aos meus avós, por todo o apoio e orgulho demonstrados.



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva**

professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva**

investigador do Centro de Ciências Moleculares e Materiais da Universidade de Lisboa

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira**

professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradeço à minha família por todo o esforço e apoio para a conclusão com sucesso desta importante etapa da meu trajeto académico.

Às Prof.<sup>a</sup> Eduarda Pereira e Joana Coimbra, agradeço a oportunidade de realização deste estágio no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro (UA), e a paciência e tempo que dispensaram na orientação deste trabalho.

Agradeço ainda a todos os companheiros de trabalho no LCA. À Lina Carvalho e Eugénio Soares pelas suas contribuições para um bom ambiente de trabalho, não só pela simpatia e compreensão, mas também pelo sentido de entreajuda, comentários, sugestões e abertura para discussão de problemas e oportunidades de melhoria, que resultaram na partilha conhecimentos e experiências que considero terem contribuído não só para o enriquecimento deste trabalho, mas também para a melhoria do funcionamento geral do laboratório. Ao meu colega estagiário Pedro Pinto agradeço as sugestões e trocas de ideias, e à colega Ana Rufino a ajuda no laboratório e a sua perspetiva mais bioquímica deste trabalho.

Agradeço também aos “companheiros de almoço”, Rui, Leonor, Nuno, Sónia, Lívia, Telma, Andreia e Tiago, que, para além da paciência para ouvirem alguns dos desabafos e frustrações resultantes deste trabalho, proporcionaram conversas bastante divertidas que, sem dúvida, contribuíram para tornar mais fácil todo este meu segundo ano de mestrado.

Não poderia esquecer-me ainda outros “companheiros de aventura” importantes nesta etapa do mestrado em Química na UA, Ana, Cristiana e Inês, e (claro) a malta dos “químicos fixes” (Rute, Tatiana, André, Joana, Ana Filipa...).

Por fim, agradeço a todas as restantes pessoas que contribuíram para o sucesso do meu percurso académico na UA, nomeadamente os bons professores e colegas/amigos que foram surgindo ao longo desse período. Neste contexto, um agradecimento especial o prof. Tito Trindade, prof.<sup>a</sup> Eduarda Pereira e Daniela Tavares, que, através da sua dedicação e ajuda na etapa final da minha licenciatura, nomeadamente na realização do projeto de licenciatura, contribuíram para que decidisse prosseguir os meus estudos no mestrado em Química da UA.



## palavras-chave

Desenvolvimento do método analítico; validação do método analítico; cabelo humano; análise multielementar; controlo/garantia da qualidade; espectrometria de massa com plasma induzido (ICP-MS)

## resumo

Este trabalho de Estágio foi realizado no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro (UA). O LCA é um laboratório acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), estando atualmente acreditado para a análise de alguns metais em água e solo. Atualmente pretende-se aumentar o número de matrizes acreditadas, tendo o cabelo sido considerado importante no âmbito de novas prestações de serviço.

As características únicas do cabelo humano conferem-lhe um potencial analítico que outras matrizes biológicas, como sangue e urina, não têm. Vários investigadores têm realizado trabalhos que envolvem a análise elementar de cabelo, com objetivos diversos. Contudo, verifica-se que as conclusões apresentadas na literatura se contradizem frequentemente quanto aos níveis de concentração determinados nesta matriz. A comunidade científica debate ainda a validade dos métodos usados na análise química de cabelo, na perspetiva da garantia da representatividade do cabelo para a avaliação do estado de saúde do indivíduo dador ou da sua exposição a determinados elementos químicos.

Para acreditar a análise de uma nova matriz, é necessário efetuar a validação dos métodos usados para a concretização dessa análise. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método para a quantificação de vários elementos em cabelo humano, com a técnica de espectrometria de massa com plasma induzido (ICP-MS).

Neste documento, é feita a apresentação do local onde decorreu o estágio e dos objetivos do trabalho. Refere-se depois a aplicação do cabelo no contexto da toxicologia, as técnicas de quantificação por atomização com plasma (ICP), com principal enfoque na técnica de espectrometria de massa (ICP-MS), e os principais conceitos associados com a validação de métodos.

Foram realizados ensaios com materiais de referência certificados de cabelo, para avaliar a eficiência das etapas de digestão e quantificação de vários elementos químicos no cabelo. Foram selecionados três elementos, cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb), para a avaliação exaustiva das várias características de desempenho consideradas na validação do método. Os resultados obtidos na análise de padrões, materiais de referência e amostras reais cumprem os requisitos de desempenho definidos no LCA, podendo considerar-se que a quantificação por ICP-MS dos três elementos referidos foi validada.

O LCA fica dotado de experiência e histórico de dados que poderão ser usados para uma futura extensão do seu âmbito de acreditação à análise de elementos químicos em cabelo.



**keywords**

Analytical method development, Analytical method validation, human hair, multi-elementary analysis, quality control/assurance, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

**abstract**

This work was performed at the Central Laboratory of Analysis (LCA) of the University of Aveiro (UA). The LCA is a laboratory accredited by the Portuguese Institute of Accreditation (IPAC) for the analysis of some metals in water and soil. Currently, the aim is to increase the number of accredited matrices, and the hair was considered important in the context of new provided services.

Because of its unique characteristics, human hair has an analytical potential that doesn't exist in other biological matrices, such as urine and blood. Several researchers have conducted studies involving the elemental analysis of hair, with various objectives. Nevertheless, the findings presented in the literature relative to the concentration levels determined in this matrix are often contradictory. The scientific community still debates the validity of the methods of hair chemical analysis to ensure the representability of hair in assessing the health status of the donor individual or the exposure to certain chemical elements.

In order to obtain the accreditation status for the analysis of a new matrix, it is necessary to validate the methods developed for this purpose. In this context, the main objective of this work was the development and validation of a method for quantification of some elements in human hair by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

In this document, the place where the work was held and the objectives of this work are presented. The application of hair in the context of toxicology, the quantification with inductively coupled plasma (ICP) techniques, with primary focus in the mass spectrometry (ICP-MS), and the key concepts associated with the validation of analytical methods are described.

Tests were performed with hair certified reference materials, to assess the efficiency of the digestion and quantification steps for the analysis of some chemical elements in the hair. Three elements were selected, copper (Cu), zinc (Zn) and lead (Pb), for the exhaustive assessment of the several performance characteristics considered in the method validation. The results of the analysis of standards, reference materials and real samples meet the performance requirements defined in the LCA. Thus, the quantification by ICP-MS of the three elements referred can be classified as validated

The LCA is now endowed with experience and data that can be used for a future extension of the scope of accreditation to the analysis of chemical elements in hair.

## Índice geral

<b>1. Apresentação do local do estágio e dos objetivos do trabalho.....</b>	<b>1</b>
1.1. O Laboratório Central de Análises .....	3
1.2. Objetivos do trabalho .....	6
<b>2. Contextualização da temática do Estágio.....</b>	<b>7</b>
2.1. O cabelo como matriz analítica .....	9
2.1.1. Principais características do cabelo.....	9
2.1.2. Perspetiva histórica da análise toxicológica de cabelo .....	15
2.1.3. Vantagens e desvantagens do cabelo como matriz analítica.....	20
2.1.4. Incorporação e análise de elementos metálicos em cabelos .....	22
2.2. Técnicas de análise com plasma acoplado indutivamente (ICP).....	28
2.2.1. Plasma – características gerais e sua aplicação à química .....	29
2.2.2. Formação de plasma.....	29
2.2.3. ICP-MS .....	31
2.2.4. Elementos quantificáveis com técnicas de ICP.....	37
2.2.5. Interferências em ICP-MS .....	38
2.3. Validação de métodos (sistemas) analíticos .....	39
2.3.1. Definição de validação de um sistema analítico e de termos associados .....	40
2.3.2. Importância da validação de sistemas analíticos.....	41
2.3.3. Processo de validação de um sistema analítico.....	42
<b>3. Trabalho laboratorial.....</b>	<b>57</b>
3.1. Lavagem de material .....	59
3.2. Determinação de elementos químicos em cabelo.....	59
3.2.1. Amostras de cabelo usadas neste trabalho .....	61
3.2.2. Recolha e armazenamento das amostras .....	63
3.2.3. Lavagem.....	64
3.2.4. Secagem das amostras de cabelo .....	66
3.2.5. Homogeneização das amostras .....	67
3.2.6. Digestão do cabelo .....	68

3.2.7. Análise das soluções por ICP-MS .....	71
3.2.8. Controlo e validação dos resultados obtidos por ICP-MS .....	84
3.2.9. Avaliação dos parâmetros de validação .....	93
<b>4. Apresentação e discussão de resultados .....</b>	<b>113</b>
4.1. Desenvolvimento do sistema analítico de quantificação multielementar em cabelo humano por ICP-MS .....	115
4.1.1. Secagem e determinação da humidade nos MRC de cabelo.....	115
4.1.2. Definição dos elementos a quantificar .....	117
4.1.3. Avaliação do procedimento de digestão e análise de cabelo .....	118
4.1.4. Avaliação da estabilidade das soluções de cabelo digerido .....	126
4.1.1. Escolha do padrão interno para a quantificação por ICP-MS .....	128
4.1.2. Avaliação da interferência do enxofre na quantificação por ICP-MS ....	134
4.1.3. Escolha dos elementos e respetivas gamas de trabalho para a validação .....	134
4.2. Validação do sistema analítico .....	135
4.2.1. Verificação da exatidão na etapa de quantificação .....	135
4.2.2. Avaliação das características de desempenho do sistema analítico ..	139
4.2.3. Resumo, comparação e interpretação dos resultados obtidos na validação .....	164
<b>5. Conclusões e perspetivas para trabalhos futuros .....</b>	<b>169</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>175</b>
6.1. Bibliografia.....	177
6.2. Referências da <i>Web</i> .....	185
<b>7. Anexos.....</b>	<b>187</b>
7.1. Intervalos de referência para a concentração de vários elementos químicos em cabelo .....	I
7.2. Procedimentos de lavagem/preparação de amostras de cabelo .....	VII
7.3. Modelo de inquérito .....	IX
7.4. Procedimento de digestão usado como referência.....	XIV

7.1. Valores de referência indicados nos vários materiais usados no controlo de qualidade externo .....	XV
7.1. Resultados obtidos na validação do sistema analítico .....	XVII
7.1.1. Avaliação da linearidade de uma das funções de calibração obtidas na análise de Pb por ICP-MS .....	XVII
7.1.2. Validação da análise de Cu em cabelo por ICP-MS .....	XXI
7.1.3. Validação da análise de Zn em cabelo por ICP-MS .....	XXVIII



## Índice de figuras

<b>Figura 1 – Localização do LCA no <i>campus</i> de Santiago da UA [2]. A:</b> Vista da ala nordeste (entrada) [3]; <b>B:</b> Vista da ala noroeste [4].....	3
<b>Figura 2 – Equipamentos de ICP existentes no LCA. A:</b> Equipamento de ICP-OES <i>Horiba Jobin Yvon Activa M</i> ; <b>B:</b> Equipamento de ICP-MS <i>Thermo X Series</i> [1].....	3
<b>Figura 3 – Símbolo “Acreditação” do LCA [1].....</b>	4
<b>Figura 4 – Hierarquia dos documentos do sistema de gestão da qualidade do LCA. A, B, C e D:</b> Documentos internos; <b>E:</b> Documentos externos.....	5
<b>Figura 5 – Estrutura da pele humana hirsuta</b> , mostrando as principais camadas, os anexos epidérmicos (pelos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas), os vasos sanguíneos e os principais recetores sensoriais (Mescher 2009). ....	9
<b>Figura 6 – Imagens obtidas por microscopia eletrónica de uma fibra de cabelo e das suas principais estruturas constituintes [8] .....</b>	10
<b>Figura 7 – Secções transversal (A) e longitudinal (B) de um cabelo dentro do respetivo folículo piloso; Representação esquemática (à esquerda) e fotomicrografia (à direita) com ampliação de 250× (Marieb <i>et al.</i> 2009).</b> As diferentes zonas indicadas na representação do folículo piloso apresentam a seguinte correspondência: <b>Zona 1:</b> Proliferação e diferenciação de células; <b>Zona 2:</b> Expressão genética da queratina e incorporação de pigmentos; <b>Zona 3:</b> Endurecimento, formação de ligações dissulfureto, reabsorção e desidratação; <b>Zona 4:</b> Degradação da bainha radicular interna <b>Zona 5:</b> Fibra de cabelo madura (Pragst <i>et al.</i> 2006, Popescu <i>et al.</i> 2007). ....	11
<b>Figura 8 – Modo de agrupamento de cadeias de queratina que formam a fibra de cabelo. (a) Cadeia simples de <math>\alpha</math>-queratina (com enrolamento dextrogiro); (b) Dímero de <math>\alpha</math>-queratina:</b> Duas cadeias simples, uma do tipo I (acídica) e outra do tipo II (básica) agrupam-se para formar um (hetero)dímero de $\alpha$ -queratina, que corresponde a uma dupla hélice (com enrolamento levogiro); (c) <b>Protofilamento:</b> Filamentos antiparalelos de dímeros de $\alpha$ -queratina associados de forma “cabeça-cauda”; (d) <b>Microfibrila:</b> A dimerização dos protofilamentos origina uma protofibrila; tetrameros de protofibrilas originam uma microfibrila; (e) <b>Organização macromolecular da fibra:</b> As microfibrilas agrupam-se para formar agregados macromoleculares ainda mais complexos, mas a caracterização desse tipo de estruturas ainda é pobre, embora se pense que tenham uma forma helicoidal (Voet <i>et al.</i> 2010, Nelson <i>et al.</i> 2013). ....	12

<b>Figura 9 – Alguns dos fatores que influenciam o grau de incorporação de substâncias químicas em cabelos (Pragst <i>et al.</i> 2006)</b> .....	22
<b>Figura 10 – Representação da sequência de geração de plasma numa tocha de ICP (Thomas 2001a)</b> .....	30
<b>Figura 11 – Mecanismo de conversão do analito dissolvido numa gota de solução no respectivo ião (Thomas 2001a)</b> .....	31
<b>Figura 12 – Detalhe dos cones na interface entre a fonte de plasma e o espectrómetro de massa (Thomas 2001b)</b> .....	31
<b>Figura 13 – Esquema representativo do princípio de funcionamento de um analisador de iões quadrupolar. (Thomas 2001c)</b> .....	32
<b>Figura 14 – Representação de um multiplicador de eletrões de dínodos discretos (Thomas 2002a)</b> .....	32
<b>Figura 15 – Circuito para a operação simultânea do detetor de dínodos discretos nos modos analógico e digital (Thomas 2002a)</b> .....	34
<b>Figura 16 – Ajuste da gama linear de resposta do detetor através da calibração cruzada.</b> As linhas a amarelo e azul correspondem, respetivamente, às gamas de resposta linear para os modos digital e analógico de funcionamento do detetor. A linha a vermelho representa a gama de resposta linear obtida após a calibração cruzada. A banda a verde delimita as taxas de contagem (cps) incluídas na gama linear de resposta do detetor de ambos os modos de deteção (Thomas 2002a) .....	34
<b>Figura 17 – Obtenção dos picos analíticos num equipamento de ICP-MS (Thomas 2002b).</b> <b>A:</b> Formação do perfil de dois picos através da acumulação de pulsos em vários canais ao longo de <i>sweeps</i> sucessivos; <b>B:</b> Obtenção de um pico por varrimento multicanal (20 <i>channels</i> por unidade de massa); <b>C:</b> Aquisição do sinal analítico em modo discreto. ....	36
<b>Figura 18 – Efeito na precisão de medidas sucessivas do sinal analítico em diferentes zonas do pico do isótopo <math>^{208}\text{Pb}</math> (Thomas 2002b)</b> .....	37
<b>Figura 19 – Tabela periódica com indicação das técnicas espectroscópicas mais adequadas para a quantificação de cada elemento (ThermoElemental 2001)</b> .....	37
<b>Figura 20 – Fluxograma representativo do procedimento genérico para a validação de um sistema analítico.</b> A requisição de um cliente poderá originar a decisão do laboratório em adotar um determinado método analítico. A validação consiste, de forma	

simplificada, em verificar que o método escolhido permite dar resposta à requisição apresentada. A adequabilidade do método para o propósito definido é verificada pelo desempenho do método, comparando-o com critérios estabelecidos, realizado por um técnico designado com os equipamentos/materiais disponíveis no laboratório (Eurachem 2014)..... 43

**Figura 21 – Ferramentas usadas tipicamente nos processos de validação de sistemas analíticos** (Eurachem 2014)..... 44

**Figura 22 – Rastreabilidade e comparabilidade metrológicas.** Neste exemplo, dois laboratórios determinam a concentração de um mesmo analito numa amostra, recorrendo a uma curva de calibração obtida com padrões preparados a partir de MR (em que a concentração de analito é bem conhecida). São considerados dois cenários diferentes: **A:** Os resultados 1 e 2 não podem ser diretamente comparados, pois são rastreáveis a dois MR independentes e sem qualquer relação; **B:** Os resultados 1 e 2 podem ser comparados, uma vez que são rastreáveis a uma mesma referência (um MRC) (Barwick *et al.* 2010)... 45

**Figura 23 – Efeitos proporcionais (variação do declive da função de calibração) e efeitos fixos (variação da ordenada na origem da função de calibração) no erro da concentração calculada com a função de calibração**..... 48

**Figura 24 – Ilustração da distinção e das relações existentes entre alguns dos conceitos mais usados em metrologia química.** Note-se que a ilustração clássica da exatidão e da precisão em termos de um padrão de tiros num alvo não descreve corretamente a exatidão, provocando uma confusão entre os conceitos de “justeza” e de “exatidão”. A exatidão está relacionada com uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos e não apenas com os erros sistemáticos, como é tipicamente referido. Note-se ainda que a avaliação da incerteza, de acordo com o “Guia para a expressão da incerteza de medição” (“*Guide to the expression of uncertainty in measurement*” – GUM) pressupõe a correção para o erro de justeza conhecido. A incerteza dessa correção ( $u_{bias}$ ), que se deve ao facto de não ser possível conhecer perfeitamente o erro sistemático, é incluída na declaração final da incerteza. Para além disso, a declaração final de incerteza deverá ser representativa do erro aleatório e sistemático, não incluindo os erros grosseiros (devidos a ignorância do operador, reagentes em mau estado de conservação ou contaminados, trocas de reagentes, material mal lavado, etc.) (Menditto *et al.* (2007), Eurachem (2014), Cruz *et al.* (2012), BIPM *et al.* (2008a) e [12]. ..... 51

**Figura 25 – Esquema das várias etapas do procedimento global de análise de amostras de cabelo com técnicas de ICP.** **A:** Recolha e armazenamento; **B:** Lavagem; **C:** Secagem (e armazenamento em exsiccador); **D:** Homogeneização e determinação da massa de amostra para análise; **E:** Digestão; **F:** Recolha, diluição e armazenamento das soluções obtidas após a digestão; **G:** Análise das soluções por ICP; **H:** Análise e interpretação dos resultados. .... 61

**Figura 26 – Regiões do couro cabeludo.** **1:** Frontal; **2:** Temporal; **3:** Vértex anterior; **4:** Vértex posterior; **5:** Nuca (Katz *et al.* 1988)..... 63

**Figura 27 – Formas de armazenamento das amostras de cabelo.** **A:** Em saco de plástico para conservação de alimentos selado; **B:** Em tubo de plástico selado. .... 64

**Figura 28 – Lavagem das amostras de cabelo (agitação magnética) ..... 65**

**Figura 29 – Esquema do forno de micro-ondas usado neste trabalho para a digestão de amostras de cabelo (CEM Mars 5 modelo 240/50).** Vista frontal do forno carregado com um carrossel de vasos *CEM XP1500 Plus* e com as sondas de temperatura (*RTP-300 Plus*) e pressão (*ESP-1500 Plus*) devidamente conectadas ao vaso de controlo [16]; Esquema dos vasos de micro-ondas usados na digestão de cabelos (*CEM XP1500 Plus*) [17,18]. .... 68

**Figura 30 – Preparação de uma amostra de cabelo para a digestão num vaso de micro-ondas CEM XP1500 Plus.** **A e B:** Determinação da massa de cabelo (MRC) para digestão; **C e D:** Adição de  $\text{HNO}_3$  concentrado; **E e F:** Acondicionamento do vaso de micro-ondas na respetiva manga de Kevlar. .... 70

**Figura 31 – Esquema do procedimento de recolha e diluição das soluções obtidas após a digestão.** **1:** Determinação da massa do frasco de recolha vazio; **2:** Diluição da solução obtida após a digestão; **3:** Agitação repetida do vaso de micro-ondas com água ultrapura para lavagem das paredes e da tampa do vaso; **4:** Adição da solução de lavagem do vaso de micro-ondas ao recipiente de recolha; **5:** Diluição da solução obtida até ao volume pretendido; **6:** Armazenamento das soluções obtidas (na ausência de luz e à temperatura ambiente). .... 71

**Figura 32 – Equipamento de ICP-MS existente no LCA (com indicação dos principais componentes)..... 72**

**Figura 33 – Fluxograma das etapas associadas à operação do equipamento de ICP-MS existente no LCA ..... 73**

**Figura 34 – Menu do *PlasmaLab* para a seleção dos isótopos e interferências a quantificar durante a análise por ICP-MS.** Os elementos assinalados com um fundo amarelo correspondem aos usados como padrão interno, enquanto os elementos com um fundo branco correspondem aos que poderão ser quantificados no cabelo. Os pontos a azul acima de cada um dos elementos representam o número de isótopos quantificados para cada um desses elementos. Os pontos a azul claro (Pb e Kr) correspondem a isótopos que estão envolvidos nas equações matemáticas usadas para correção de sinal. Por fim, os elementos com o respetivo símbolo químico a azul claro (C) correspondem aos interferentes de matriz (Ar, O, N, C, H e OH). ..... 75

**Figura 35 – Procedimento global de preparação das soluções padrão para a obtenção das funções de calibração a usar na quantificação por ICP-MS. 1, 2 e 3:** Medição das massas correspondentes aos volumes pretendidos dos padrões multielementares IV-ICPMS-71-A e IV-ICPMS-71B e dos padrões monoelementares. **4:** Diluição da mistura obtida com branco de calibração até ao volume pretendido ( $\approx 50$  mL); **5:** Obtenção do padrão intermédio a partir do qual, por diluição, é feita a preparação dos padrões de calibração. **6 e 7:** Preparação dos padrões de calibração, por medição direta nos tubos do amostrador automático da massa correspondente aos volumes pretendidos do “padrão pai” “CT1” e diluição com branco de calibração para o volume pretendido ( $\approx 10$  mL); **8:** Distribuição dos tubos nas posições pretendidas do suporte (*rack*) do amostrador automático. Após a preparação de cada padrão, o tubo correspondente é tapado com uma rolha de plástico ou *parafilm* para evitar a introdução de poeiras nas soluções preparadas. .... 77

**Figura 36 – Dispersão das medições de sinal analítico ao longo de uma determinada gama de concentrações. A:** Homogeneidade de variâncias; **B:** Heterocedasticidade [19] ..... 78

**Figura 37 – Menu “Results” do *PlasmaLab*, onde é apresentado o relatório dos resultados obtidos na quantificação de vários elementos.** Os isótopos assinalados a azul e a roxo correspondem, respetivamente, aos quantificados com o método de calibração típico (“*fully quantified*”) e aos quantificados com o modo semiquantitativo (“*semi-quantified*”). Os valores assinalados com fundo amarelo correspondem aos resultados obtidos na análise dos isótopos que podem ser usados como padrão interno. .... 79

<b>Figura 38 – Efeito na função de calibração de um branco de calibração com um nível de contaminação diferente (significativamente superior) ao dos padrões de calibração. ....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 39 – Distribuição normal e relação entre os níveis de confiança e o desvio-padrão da distribuição .....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 40 – Exemplo de carta de controlo e sua relação com a distribuição normal (Hovind <i>et al.</i> 2011) .....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 41 – Distribuição <i>t</i> de Student.</b> A função densidade de probabilidade para a variável independente $x$ é representada por $f(x)$ . Os números entre parênteses são os graus de liberdade correspondentes a cada uma das formas da distribuição. ....	<b>98</b>
<b>Figura 42 – Distribuição <math>\chi^2</math> (chi-quadrado) (soma dos quadrados de variáveis com distribuição normal).</b> A função densidade de probabilidade para a variável independente $x$ é representada por $f(x)$ . Os números entre parênteses são os graus de liberdade correspondentes a cada uma das formas da distribuição. ....	<b>98</b>
<b>Figura 43 – Distribuição de Fisher (razão entre variáveis com distribuição <math>\chi^2</math>).</b> A função densidade de probabilidade para a variável independente $x$ é representada por $f(x)$ . Os números entre parênteses são os graus de liberdade correspondentes a cada uma das formas da distribuição. ....	<b>98</b>
<b>Figura 44 – Possíveis interpretações erróneas do coeficiente de correção de Pearson (<math>r</math>) (A e B) e gráficos de resíduos para avaliação do ajuste da função linear aos dados experimentais (C, D, E e F) (Miller <i>et al.</i> 2010).</b> <b>A:</b> Obtenção de um valor elevado de $r$ para um conjunto de dados que se correlaciona por um modelo quadrático; <b>B:</b> Obtenção de um valor nulo de $r$ para um conjunto de dados que se correlaciona perfeitamente de acordo com um modelo quadrático. As linhas a tracejado em A e B correspondem às funções de calibração lineares obtidas com o método dos mínimos desvios quadrados. <b>C:</b> Distribuição satisfatória (aleatória) dos resíduos; <b>D:</b> Aumento dos resíduos com o aumento da concentração dos padrões, o que indica um aumento da variância associada às leituras de sinal analítico (heterocedasticidade); <b>E:</b> Tendência clara na distribuição dos resíduos (6 primeiros resíduos com valores negativos e os 8 seguintes com valores positivos); <b>F:</b> Gráfico de resíduos satisfatório, mas com a presença de um valor aberrante (“ <i>outlier</i> ”). ....	<b>100</b>

<b>Figura 45 – Recuperações médias (pontos) e respectivos desvios-padrão (barras de erro a azul e a tracejado) e intervalos de confiança (barras de erro a preto) na análise por ICP-MS, em vários dias, de soluções do MRC ERM DB001 digerido.....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 46 – Recuperações médias (pontos) e respectivos desvios-padrão (barras de erro a azul e a tracejado) e intervalos de confiança (barras de erro a preto) na análise por ICP-MS, em vários dias, de soluções do MRC GBW 09101b digerido .....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 47 – Dispersão das razões entre a concentração calculada de vários elementos nos brancos de digestão e a concentração de referência do MRC ERM DB001 .....</b>	<b>124</b>
<b>Figura 48 – Dispersão das razões entre a concentração calculada de vários elementos nos brancos de digestão e a concentração de referência MRC GBW 09101b .....</b>	<b>125</b>
<b>Figura 49 – Variação das concentrações médias calculadas, relativamente à concentração média obtida na 1ª quantificação por ICP-MS, para três soluções obtidas numa das digestões do MRC ERM DB001.....</b>	<b>127</b>
<b>Figura 50 – Variação das concentrações médias calculadas, relativamente à concentração média obtida na 1ª quantificação por ICP-MS, para duas soluções obtidas numa das digestões do MRC ERM DB001 .....</b>	<b>127</b>
<b>Figura 51 – Variação das concentrações médias calculadas, relativamente à concentração média obtida na 1ª quantificação por ICP-MS, para três soluções obtidas numa das digestões do MRC GBW 09101b .....</b>	<b>128</b>
<b>Figura 52 – Concentração de enxofre (<math>^{33}\text{S}</math>) calculada para várias soluções analisadas por ICP-MS .....</b>	<b>129</b>
<b>Figura 53 – Concentração de carbono (<math>^{13}\text{C}</math>) calculada para várias soluções analisadas por ICP-MS .....</b>	<b>130</b>
<b>Figura 54 – Variação da percentagem de recuperação do padrão interno (<math>R_{PI}</math>) ao longo de uma análise por ICP-MS para os vários isótopos usados como padrão interno.....</b>	<b>131</b>
<b>Figura 55 – Variação da percentagem recuperação para vários isótopos distribuídos ao longo do espectro de massa, considerando diferentes modos de correção com padrão interno, na leitura do MRC de cabelo GBW 09101b num dos dias de análise por ICP-MS .....</b>	<b>133</b>

<b>Figura 56 – Carta de controlo para o <i>z-score</i> na análise de Pb por ICP-MS do PVFC RELACRE junho 2012 (Cref<math>\approx</math>18<math>\pm</math>3 <math>\mu</math>g/L) .....</b>	<b>136</b>
<b>Figura 57 – Carta de controlo para o <i>z-score</i> na análise de Pb por ICP-MS do PVFC RELACRE julho 2014 (Cref<math>\approx</math>19<math>\pm</math>3 <math>\mu</math>g/L) .....</b>	<b>136</b>
<b>Figura 58 – Carta de controlo para a recuperação de Pb na análise por ICP-MS do PVFC(CT1) (Cref<math>\approx</math>50 <math>\mu</math>g/L) .....</b>	<b>137</b>
<b>Figura 59 – Carta de controlo para a recuperação de Pb na análise por ICP-MS do PVFC(CT2) (Cref<math>\approx</math>10 <math>\mu</math>g/L) .....</b>	<b>137</b>
<b>Figura 60 – Carta de controlo para as recuperações obtidas na análise de Pb por ICP-MS em soluções de cabelo digerido reforçadas com esse elemento .....</b>	<b>139</b>
<b>Figura 61 – Função de calibração (linear) obtida na análise de Pb por ICP-MS a 25/05/2015 .....</b>	<b>143</b>
<b>Figura 62 – Análise de Pb por ICP-MS dos padrões de calibração (25/05/2015); A: Desvio-padrão das leituras do sinal analítico, em condições de repetibilidade; B: Gráfico dos resíduos pesados.....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 63 – Representação gráfica das funções de calibração obtidas com os modelos pesados linear e quadrático, para o ajuste aos dados obtidos na análise de Pb por ICP-MS de 25/05/2015.....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 64 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Pb obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de calibração .....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 65 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Pb obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de digestão .....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 66 – Carta de controlo para a recuperação de Pb (relativamente à concentração de referência de <math>\approx</math>1 <math>\mu</math>g/L) na análise por ICP-MS do PVLQ .....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 67 – Coeficiente variação (desvio-padrão relativo) obtido nas três réplicas de leitura realizadas na análise de Pb por ICP-MS .....</b>	<b>150</b>
<b>Figura 68 – Coeficientes de variação de repetibilidade (<math>CV_r</math>) associados à quantificação de Pb por ICP-MS em várias soluções. “Quantif.”: Desvio-padrão relativo de 10 réplicas de leitura da concentração (<math>\mu</math>g/L) de Pb numa mesma solução aspirada repetidamente (aspirações da solução de teste intercaladas com aspiração da solução de lavagem); “Dig.”: Desvio-padrão relativo da leitura da concentração (<math>\mu</math>g/g). de 10 réplicas</b>	



de digestão (aspiração sucessivas de soluções de várias porções de uma amostra de cabelo digerido num único ciclo de digestão)..... 151

**Figura 69 – Carta de controlo para a diferença relativa entre duplicados de leitura da concentração de Pb obtida na análise por ICP-MS, em condições de repetibilidade (leituras consecutivas da mesma solução, intercaladas por aspiração da solução de lavagem do equipamento) ..... 153**

**Figura 70 – Carta de controlo para a diferença relativa entre as concentrações de Pb obtidas na análise por ICP-MS de duplicados de digestão, em condições de repetibilidade ..... 153**

**Figura 71 – Carta de controlo da recuperação de Pb obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM DB001 ..... 159**

**Figura 72 – Carta de controlo da recuperação de Pb obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC GBW 09101b ..... 159**

**Figura 73 – Carta de controlo da recuperação de Pb obtida em todas as análises válidas por ICP-MS do MRC ERM DB001 ..... 160**

**Figura 74 – Carta de controlo da recuperação de Pb obtida em todas as análises válidas por ICP-MS do MRC GBW 09101b ..... 160**

**Figura 75 – Comparação das concentrações de Pb ( $\mu\text{g/L}$ ) obtidas na análise por ICP-MS dos dois conjuntos de padrões aquosos preparados para avaliação do erro de justeza da digestão ..... 161**

**Figura 76 – Nota técnica da CEM que foi usada como referência no desenvolvimento do procedimento de digestão usado neste trabalho..... XIV**

**Figura 77 – Carta de controlo das recuperações obtidas na análise de Cu por ICP-MS em soluções de cabelo digerido reforçadas com esse elemento ..... XXI**

**Figura 78 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Cu obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de calibração .....XXII**

**Figura 79 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Cu obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de digestão .....XXII**

**Figura 80 – Carta de controlo para a recuperação de Cu (relativamente à concentração de referência de  $\approx 2 \mu\text{g/L}$ ) na análise por ICP-MS do PVLQ ..... XXIII**

**Figura 81 – Coeficiente variação (desvio-padrão relativo) obtido nas três réplicas de leitura realizadas na análise de Cu por ICP-MS ..... XXIV**

**Figura 82 – Coeficientes de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) associados à quantificação de Cu por ICP-MS em várias soluções. “Quantif.”: Desvio-padrão relativo de 10 réplicas de leitura da concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) de Pb numa mesma solução aspirada repetidamente (aspirações da solução de teste intercaladas com aspiração da solução de lavagem); “Dig.”: Desvio-padrão relativo da leitura da concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) de 10 réplicas de digestão (aspiração sucessivas de soluções de várias porções de uma amostra de cabelo digerido num único ciclo de digestão)..... XXIV**

**Figura 83 – Carta de controlo para a diferença relativa entre duplicados de leitura da concentração de Cu obtida na análise por ICP-MS, em condições de repetibilidade (leituras consecutivas da mesma solução, intercaladas por aspiração da solução de lavagem do equipamento) ..... XXV**

**Figura 84 – Carta de controlo para a diferença relativa entre as concentrações de Cu obtidas na análise por ICP-MS de duplicados de digestão, em condições de repetibilidade ..... XXV**

**Figura 85 – Carta de controlo da recuperação de Cu obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM DB001 ..... XXVI**

**Figura 86 – Carta de controlo da recuperação de Cu obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM GBW09101..... XXVI**

**Figura 87 – Comparação das concentrações de Cu ( $\mu\text{g/L}$ ) obtidas na análise por ICP-MS dos dois conjuntos de padrões aquosos preparados para avaliação do erro de justeza da digestão .....XXVII**

**Figura 88 – Carta de controlo das recuperações obtidas na análise de Zn por ICP-MS em soluções de cabelo digerido reforçadas com esse elemento ..... XXVIII**

**Figura 89 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Zn obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de calibração ..... XXIX**

**Figura 90 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Zn obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de digestão ..... XXIX**

**Figura 91 – Carta de controlo para a recuperação de Zn (relativamente à concentração de referência de  $\approx 10 \mu\text{g/L}$ ) na análise por ICP-MS do PVLQ ..... XXX**

**Figura 92 – Coeficiente variação (desvio-padrão relativo) obtido nas três réplicas de leitura realizadas na análise de Zn por ICP-MS ..... XXX**

**Figura 93 – Coeficientes de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) associados à quantificação de Zn por ICP-MS em várias soluções. “Quantif.”: Desvio-padrão relativo de 10 réplicas de leitura da concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) de Pb numa mesma solução aspirada repetidamente (aspirações da solução de teste intercaladas com aspiração da solução de lavagem); “Dig.”: Desvio-padrão relativo da leitura da concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) de 10 réplicas de digestão (aspiração sucessivas de soluções de várias porções de uma amostra de cabelo digerido num único ciclo de digestão)..... XXXI**

**Figura 94 – Carta de controlo da diferença relativa entre duplicados de leitura da concentração de Zn obtida na análise por ICP-MS, em condições de repetibilidade (leituras consecutivas da mesma solução, intercaladas por aspiração da solução de lavagem do equipamento) .....XXXII**

**Figura 95 – Carta de controlo da diferença relativa entre as concentrações de Zn obtidas na análise por ICP-MS de duplicados de digestão, em condições de repetibilidade .....XXXII**

**Figura 96 – Carta de controlo da recuperação de Zn obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM DB001 ..... XXXIII**

**Figura 97 – Carta de controlo da recuperação de Zn obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC GBW 09101b..... XXXIII**

**Figura 98 – Comparação das concentrações de Zn ( $\mu\text{g/L}$ ) obtidas na análise por ICP-MS dos dois conjuntos de padrões aquosos preparados para avaliação do erro de justeza da digestão ..... XXXIV**

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Valores de referência para algumas das principais características do couro cabeludo humano (Harkey 1993) [8] .....	13
Tabela 2 – Comparação da concentração média de vários elementos em cabelo ( $\mu\text{g/g}$ ) e no sangue ( $\text{mg/L}$ ) (Rodushkin <i>et al.</i> 2000).....	20
Tabela 3 – Distinção entre os diferentes tipos de condições de precisão que deverão ser considerados na validação de um sistema analítico (assim como no seu uso rotineiro) (RELACRE 2000, Cruz <i>et al.</i> 2012, Eurachem 2014). ....	52
Tabela 4 – Comparação dos dois tipos de amostras de cabelo consideradas neste trabalho: MRC e amostras reais .....	61
Tabela 5 – Recomendações que deverão ser seguidas na preparação dos MRC de cabelo para a respetiva análise [13,14] .....	62
Tabela 6 – Valores de referência para os parâmetros de aquisição do sinal analítico no modo “ <i>peak jump</i> ” (Coimbra 2007).....	76
Tabela 7 – Variáveis que fundamentam os cálculos estatísticos associados ao modelo linear de calibração pesada (ver Tabela 8).....	79
Tabela 8 – Equações usadas no cálculo da função de calibração com o modelo pesado dos mínimos desvios quadrados (Asuero <i>et al.</i> 2006, Miller <i>et al.</i> 2010) .....	80
Tabela 9 – Exemplos de correção do sinal do analito com os valores de recuperação do padrão interno ( $R_{PI}$ ) e da ordenada na origem da função de calibração ( $b_w$ ).....	82
Tabela 10 – Soluções envolvidas na operação do equipamento de ICP-MS ....	85
Tabela 11 – Critérios típicos de $z$ -score para avaliação do desempenho do laboratório na medição de uma determinada propriedade (RELACRE 1996). ....	90
Tabela 12 – Requisitos de controlo da qualidade considerados neste trabalho	92
Tabela 13 – Testes estatísticos aplicados neste trabalho para a avaliação da correlação linear das variáveis e do ajuste do modelo matemático de calibração e distribuições estatísticas em que se fundamentam (Cordeiro <i>et al.</i> 2004). ....	98
Tabela 14 – Equações usadas nas várias estratégias adotadas neste trabalho para avaliação do ajuste do modelo matemático de calibração aos dados experimentais .....	101

<b>Tabela 15 – Equações usadas no teste de avaliação do ajuste da função de calibração através de uma “ANOVA pesada” .....</b>	<b>103</b>
<b>Tabela 16 – Equações usadas no cálculo da função de calibração com o modelo quadrático pesado (Lavagnini <i>et al.</i> 2007) .....</b>	<b>104</b>
<b>Tabela 17 – Fatores de variabilidade para os quais foram realizadas estimativas da precisão .....</b>	<b>105</b>
<b>Tabela 18 – Tabela para aplicação de um teste ANOVA unidimensional.....</b>	<b>106</b>
<b>Tabela 19 – Humidade dos MRC de cabelo usados neste trabalho .....</b>	<b>115</b>
<b>Tabela 20 – Identificação dos elementos quantificáveis com valores de referência das concentrações para os MRC .....</b>	<b>117</b>
<b>Tabela 21 – Concentração de vários elementos nas soluções de branco de digestão (comparação com o valor máximo do LD) .....</b>	<b>122</b>
<b>Tabela 22 – Gamas de massas abrangidas por cada um dos isótopos usados como padrão interno na análise por ICP-MS de soluções de cabelo digerido .....</b>	<b>132</b>
<b>Tabela 23 – Interferências isobáricas formadas pela presença de enxofre no plasma (May <i>et al.</i> 1998) .....</b>	<b>134</b>
<b>Tabela 24 – Gamas de trabalho definidas para os elementos considerados na validação do sistema analítico .....</b>	<b>135</b>
<b>Tabela 25 – Interferências isobáricas comuns na quantificação de chumbo por ICP-MS (May <i>et al.</i> 1998, ISO 2004).....</b>	<b>140</b>
<b>Tabela 26 – Parâmetros das funções de calibração válidas obtidas na análise de Pb por ICP-MS .....</b>	<b>142</b>
<b>Tabela 27 – Resultados obtidos no cálculo dos modelos linear e quadrático de calibração na análise de Pb por CIP-MS de 25/05/2015 .....</b>	<b>143</b>
<b>Tabela 28 – Testes estatísticos aplicados na avaliação do ajuste/linearidade da função de calibração obtida para o Pb na análise por ICP-MS de 25/05/2015 .....</b>	<b>145</b>
<b>Tabela 29 – Cálculo do LD e do LQ para a quantificação de Pb por ICP-MS, de acordo com o procedimento indicado no Guia 13 da RELACRE (RELACRE 2000) .....</b>	<b>148</b>
<b>Tabela 30 – Dados obtidos na análise de Pb por ICP-MS de uma amostra real de cabelo digerida em três dias de análise .....</b>	<b>154</b>
<b>Tabela 31 – Tabela obtida após aplicação do teste ANOVA unidimensional aos dados apresentados na Tabela 30 .....</b>	<b>154</b>

<b>Tabela 32 – Dados obtidos para a concentração de chumbo no cabelo (<math>\mu\text{g/g}</math>) na análise em 4 dias das três réplicas de digestão do MRC GBW 09101b .....</b>	<b>155</b>
<b>Tabela 33 –Tabela obtida após aplicação do teste ANOVA unidimensional aos dados apresentados na Tabela 32.....</b>	<b>155</b>
<b>Tabela 34 – Resultados obtidos na avaliação da precisão recorrendo à aplicação do teste ANOVA unidimensional .....</b>	<b>156</b>
<b>Tabela 35 – Tabela-resumo com os resultados obtidos na estimativa da incerteza associada à quantificação de Pb com o sistema analítico usado neste trabalho e com base nos dois MRC de cabelo analisados.....</b>	<b>162</b>
<b>Tabela 36 – Valores de incerteza-padrão referentes à quantificação de cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb) em cabelo, estimados com base na análise ao MRC RMDB001 .....</b>	<b>165</b>
<b>Tabela 37 – Tabela resumo da validação da análise de chumbo (<math>^{206}\text{Pb} + ^{207}\text{Pb} + ^{208}\text{Pb}</math>) em cabelos por ICP-MS .....</b>	<b>166</b>
<b>Tabela 38 – Tabela resumo da validação da análise de cobre (<math>^{65}\text{Cu}</math>) em cabelos por ICP-MS .....</b>	<b>167</b>
<b>Tabela 39 – Tabela resumo da validação da análise de zinco (<math>^{66}\text{Zn}</math>) em cabelos por ICP-MS .....</b>	<b>168</b>
<b>Tabela 40 – Intervalos de concentração apresentados em vários artigos científicos para a concentração de vários elementos em cabelo humano .....</b>	<b>I</b>
<b>Tabela 41 – Requisitos, técnicas analíticas e valores de concentração de referência de vários laboratórios comerciais para a quantificação multielementar em cabelo humano .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabela 42 – Compilação de alguns dos procedimentos de lavagem de cabelo referidos na literatura científica.....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabela 43 – Concentrações de referência em algumas das soluções aquosas usadas como padrões de verificação da função de calibração (PVFC) neste trabalho .....</b>	<b>XV</b>
<b>Tabela 44 – Valores de concentração teóricos de vários elementos nos MRC de cabelo usados neste trabalho. Os valores com indicação da incerteza expandida (<math>U</math>) correspondem a concentrações certificadas, e os restantes a concentrações de referência. ....</b>	<b>XVI</b>

<b>Tabela 45 – Cálculos para a definição dos modelos pesados de calibração (linear e quadrático) da análise de Pb por ICP-MS realizada a 25/05/2015 .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Tabela 46 – Cálculos dos resíduos e das concentrações de Pb (µg/L) dos padrões de calibração com o modelo linear de calibração pesada .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Tabela 47 - – Cálculos dos resíduos e das concentrações de Pb (µg/L) dos padrões de calibração com o modelo quadrático de calibração pesada.....</b>	<b>XIX</b>
<b>Tabela 48 – Cálculos das somas dos quadrados e dos quadrados médios para aplicação da “ANOVA pesada” ao modelo linear pesado de calibração.....</b>	<b>XIX</b>
<b>Tabela 49 – Cálculos das somas dos quadrados e dos quadrados médios necessários à aplicação da “ANOVA pesada” ao modelo linear pesado de calibração .....</b>	<b>XX</b>
<b>Tabela 50 – Parâmetros das funções de calibração válidas obtidas na análise de Cu por ICP-MS.....</b>	<b>XXI</b>
<b>Tabela 51 – Parâmetros das funções de calibração válidas obtidas na análise de Zn por ICP-MS .....</b>	<b>XXVIII</b>





# **1. Apresentação do local do estágio e dos objetivos do trabalho**



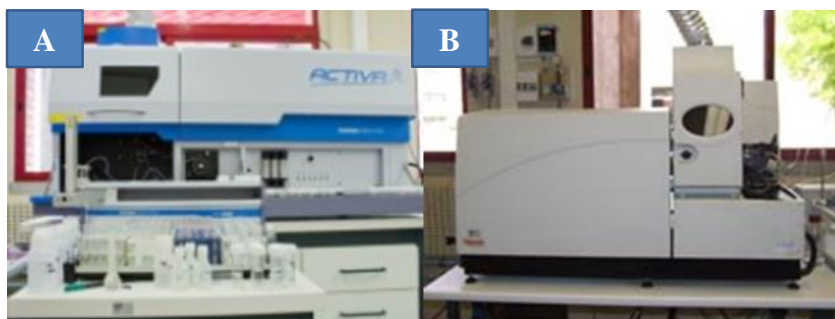
### 1.1. O Laboratório Central de Análises

O trabalho de Estágio foi realizado no Laboratório Central de Análises (LCA), uma unidade executiva da Universidade de Aveiro (UA) localizada no *campus* de Santiago (**Figura 1**). A atividade do LCA tem como principal objetivo a prestação de serviços de qualidade aos investigadores da UA, mas também a entidades externas públicas e privadas. O LCA garante apoio científico e técnico qualificado nas suas áreas de competência, otimizando e rentabilizando os seus recursos no apoio ao meio empresarial e académico [1].



**Figura 1** – Localização do LCA no *campus* de Santiago da UA [2]. A: Vista da ala nordeste (entrada) [3]; B: Vista da ala noroeste [4]

O LCA possui atualmente quatro serviços: ICP (análise química usando técnicas instrumentais com plasma induzido), difração de raios X (DRX), geologia isotópica (LGI) e diagnóstico molecular de aquaculturas (DMA). No serviço ICP, onde decorreu o Estágio apresentado neste documento, o LCA dispõe de dois equipamentos com plasma induzido: um espectrómetro de massa (ICP-MS) *Thermo X Series* e um espectrofotómetro de emissão atómica (ICP-OES) *Horiba Jobin Yvon Activa M* (**Figura 2**), operados por técnicos devidamente qualificados. Este serviço permite a análise simultânea da maioria dos elementos da tabela periódica (análise multielementar) em várias matrizes analíticas.



**Figura 2** – Equipamentos de ICP existentes no LCA. A: Equipamento de ICP-OES *Horiba Jobin Yvon Activa M*; B: Equipamento de ICP-MS *Thermo X Series* [1]

Para apoio ao serviço de ICP, o LCA está dotado de um laboratório com o material e equipamento necessários para o armazenamento, a conservação e a preparação de padrões

e amostras, o que permite dar resposta aos casos em que é necessário converter as amostras entregues pelo cliente numa solução analisável pelos equipamentos de ICP.

Na sequência de um processo iniciado em 2010, o LCA possui, desde fevereiro de 2013, o estatuto de laboratório acreditado, i.e. a sua competência técnica e de gestão está devidamente reconhecida, pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), para a realização de ensaios químicos usando técnicas de ICP [1]. Esse reconhecimento resultou na emissão do Anexo Técnico de Acreditação Nº L0627-1, publicado nos *websites* do LCA [1] e IPAC [5], onde é apresentada a lista de ensaios

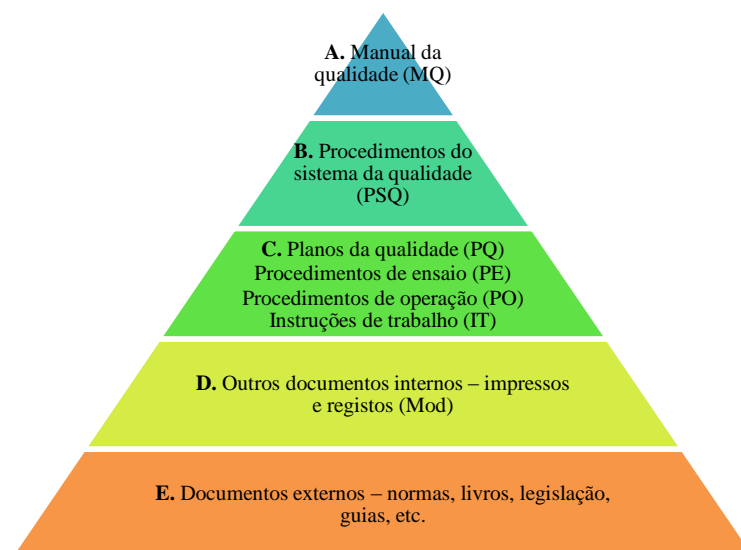


Figura 3 – Símbolo “Acreditação” do LCA [1]

abrangidos pelo âmbito da acreditação, e na concessão de autorização para a utilização pelo LCA do respetivo Símbolo “Acreditação” (imagem gráfica que identifica a entidade acreditada pelo IPAC [6]), reproduzido na **Figura 3**.

A norma internacional que foi considerada para a concessão dessa acreditação (e que continua a ser considerada para a manutenção desse estatuto) foi a norma ISO/IEC 17025:2005 (ISO/IEC 2005) [1], que, por ter sido adotada como norma portuguesa, é designada pelo IPAC como NP ISO/IEC 17025:2005, e intitulada “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”. O cumprimento dos vários requisitos dessa norma garante ainda a conformidade do sistema de gestão do laboratório com a norma ISO 9001:2000 (“*Quality management systems – Requirements*”) (ISO/IEC 2005).

No âmbito do sistema de gestão, o LCA possui uma estrutura hierárquica de documentos, devidamente compilada numa lista-mestre. Essa estrutura de documentos regula as várias atividades do laboratório e é sujeita a uma constante revisão e atualização, quer por iniciativas internas, quer por observações que decorrem de avaliações realizadas por entidades externas ao LCA (auditorias). Na **Figura 4** é feita uma representação da estrutura documental do sistema de gestão do LCA.



**Figura 4 – Hierarquia dos documentos do sistema de gestão da qualidade do LCA.** A, B, C e D: Documentos internos; E: Documentos externos

A necessidade de acreditação dos serviços do LCA surgiu no seguimento de várias solicitações apresentadas pelos clientes. O âmbito inicial de acreditação do LCA abrangia a quantificação de um número limitado de elementos químicos por ICP-OES e ICP-MS em águas naturais e/ou de consumo humano. Com a aquisição de conhecimento e experiência, o âmbito da acreditação foi entretanto alargado, englobando atualmente a quantificação de vários elementos num outro tipo de matriz analítica: os solos. Para além disso, em fevereiro de 2014, o LCA formalizou a transição do regime de acreditação, passando de um regime de descrição fixa para um regime de descrição flexível global. As diferenças entre os vários regimes de acreditação e a identificação dos requisitos necessários para cada um destes podem ser consultados no DRC005 do IPAC, disponível no *website* dessa instituição [7]. O atual tipo de regime de acreditação do LCA é bastante vantajoso, pois proporciona uma maior flexibilidade dos parâmetros acreditados. Assim, se for necessário adicionar um novo elemento à lista de parâmetros acreditados do serviço de ICP do LCA para a análise de águas e solos, será apenas necessário proceder à validação do método usado na quantificação desse novo analito, comunicando os resultados obtidos ao IPAC, o que permite incrementar a capacidade de resposta e, consequentemente, a competitividade.

A política interna do LCA visa a melhoria contínua e a aplicação de princípios de controlo/garantia da qualidade que permitam assegurar a validade dos resultados produzidos, o que é essencial para a manutenção do estatuto de entidade acreditada. Essa política da qualidade está assente nos seguintes valores: confiança, confidencialidade, fiabilidade, integridade e profissionalismo.

Um dos princípios básicos das boas práticas de qualidade em laboratórios de ensaio (classificação na qual se enquadra o LCA) é a validação dos respetivos métodos de análise. Essa prática acaba por adquirir uma relevância ainda maior no contexto da descrição flexível global. Assim, é indiscutível a elevada importância da validação dos procedimentos de ensaio usados em laboratórios de análises químicas, o que justifica o investimento realizado no trabalho apresentado neste documento. Este trabalho permitirá ao LCA alargar as suas competências em termos de tipo de matriz sujeita a análise por ICP, mas também a sua lista de potenciais clientes externos, nomeadamente laboratórios de análises clínicas e hospitais, dotando ainda a UA de meios que potenciem a investigação científica de qualidade em trabalhos que envolvam a análise elementar de cabelo.

## **1.2. Objetivos do trabalho**

Os principais objetivos do trabalho apresentado neste relatório de Estágio são:

- Recolha de informação sobre as particularidades do cabelo humano como matriz analítica e da evolução e estado atual da investigação relativamente à quantificação multielementar nesse tipo de matriz;
- Desenvolvimento e validação de um método de quantificação multielementar em cabelo humano por espectrometria de massa com plasma induzido (ICP-MS);
- Recolha de amostras de cabelo humano e sua análise.

Relativamente ao último objetivo, a recolha das amostras foi acompanhada do preenchimento de um inquérito (secção de Anexos). Esse procedimento teve como objetivo a recolha dos dados necessários para que o LCA à utilização das amostras recolhidas na realização de trabalhos de investigação que envolvam a avaliação de relações entre as características dos indivíduos dadores e as concentrações de determinados elementos nos seus cabelos.

Este trabalho enquadrou-se no planeamento de atividades do LCA para os anos de 2014 e 2015. A realização deste tipo de trabalho decorreu do objetivo do LCA de alargar as suas competências e de dar continuidade a trabalho de investigação na área da análise elementar de cabelo desenvolvido anteriormente no LCA, na perspetiva da acreditação do método para a quantificação multielementar em cabelo por ICP

## **2. Contextualização da temática do Estágio**



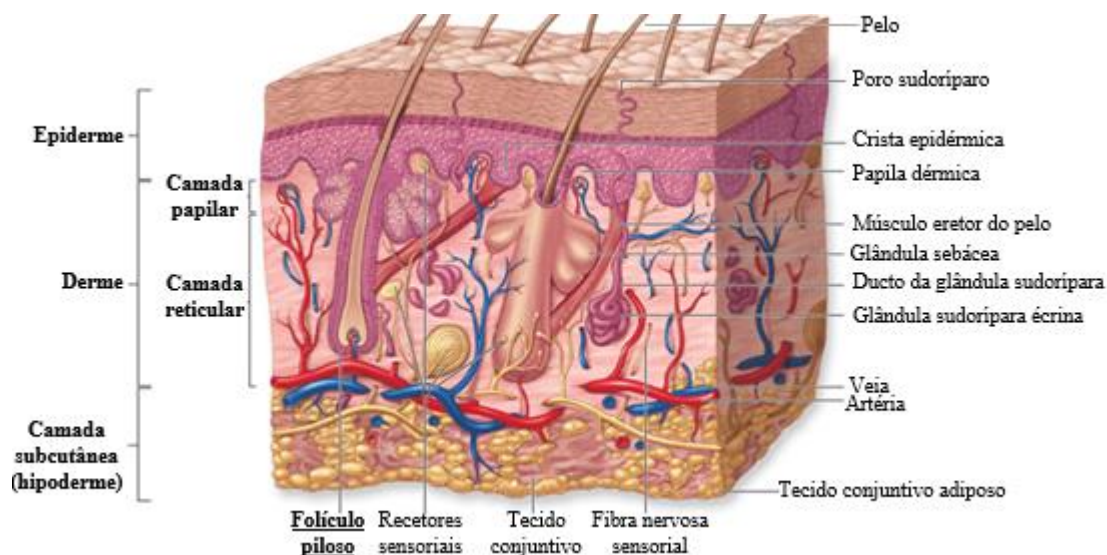


## 2.1. O cabelo como matriz analítica

Como o trabalho de Estágio apresentado neste documento envolveu a análise química multielementar em cabelo humano, são apresentados, nesta secção introdutória, vários aspetos relacionados com este tipo de matriz, referindo algumas das suas particularidades e enquadrando este tipo de análise no contexto da investigação científica atual.

### 2.1.1. Principais características do cabelo

A pele é o maior órgão do corpo humano e a sua função principal é garantir a homeostasia do organismo. Pode ser classificada como glabra ou hirsuta, sendo que essa classificação depende da presença ou ausência de folículos pilosos e glândulas sebáceas e da espessura da camada superficial. A epiderme da pele glabra tem uma espessura superior à da pele hirsuta (Zaidi *et al.* 2013). A ocorrência de pelos verifica-se somente na pele hirsuta (**Figura 5**), pois apenas esta possui glândulas sebáceas e folículos pilosos.



**Figura 5** – Estrutura da pele humana hirsuta, mostrando as principais camadas, os anexos epidérmicos (pelos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas), os vasos sanguíneos e os principais recetores sensoriais (Mescher 2009).

O pelo é uma das características que define os mamíferos (Jablonski 2013). Assim, a pele dos humanos possui pelo, excetuando-se a pele glabra, que cobre, entre outras zonas do corpo, os lábios, as palmas das mãos e as plantas dos pés (Mescher 2013).

A pele que reveste o crânio humano (couro cabeludo ou escalpo) é, excluindo os casos de calvície, uma das zonas do corpo com maior densidade de pelos. (Vogt *et al.* 2008, Robbins 2012c). Esses pelos são normalmente designados por cabelo e possuem uma função excretora, permitindo a acumulação nesse tecido de substâncias que, pelas suas características e/ou pela quantidade em que estão presentes, sejam uma ameaça para o bom funcionamento do organismo, constituindo portanto uma “área de quarentena biológica”

(Grupe *et al.* 1989). Por esse motivo, a análise química de cabelo pode ser útil na avaliação da presença de determinadas substâncias químicas no organismo.

A anatomia do cabelo e as suas interações com as estruturas da pele influenciam a concentração de substâncias químicas nessa de matriz (Harkey 1993). Portanto, a interpretação dos resultados obtidos em análises químicas do cabelo requer um entendimento básico da biologia associada a esse tipo de tecido.

Os cabelos são estruturas alongadas de espessura reduzida que se formam em invaginações da epiderme, chamadas de folículos pilosos, e são constituídas maioritariamente por células mortas queratinizadas (Gunasegaran 2014). A superfície da fibra de cabelo consiste em células que se sobrepõem umas sobre as outras de forma análoga a telhas num telhado ou a escamas num peixe, constituindo a cutícula. As células da cutícula revestem o córtex, que corresponde à estrutura que abrange a maior parte da massa da fibra de cabelo (cerca de 90% da massa total). O córtex é constituído por células fusiformes, alinhadas paralelamente com o eixo da fibra de cabelo, e contém a maioria do conteúdo de proteínas fibrosas. Os cabelos mais grossos possuem frequentemente uma estrutura central, chamada de medula, com um empacotamento menos eficiente de células e, por isso, poroso. A quarta estrutura principal da fibra de cabelo é a “cola” resultante da combinação de proteínas e lípidos que assegura a coesão de toda a fibra de cabelo (Robbins 2012c). As estruturas referidas neste parágrafo estão representadas na **Figura 6** e na **Figura 7**, que correspondem, respetivamente, a fotografias, obtidas por microscopia eletrónica e microscopia ótica, de uma fibra de cabelo e de um folículo piloso.

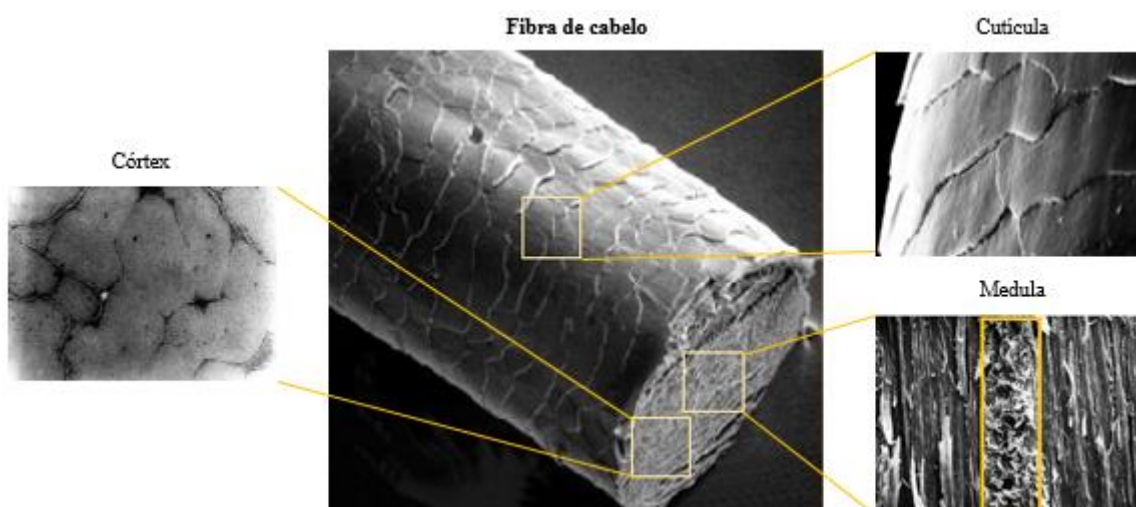
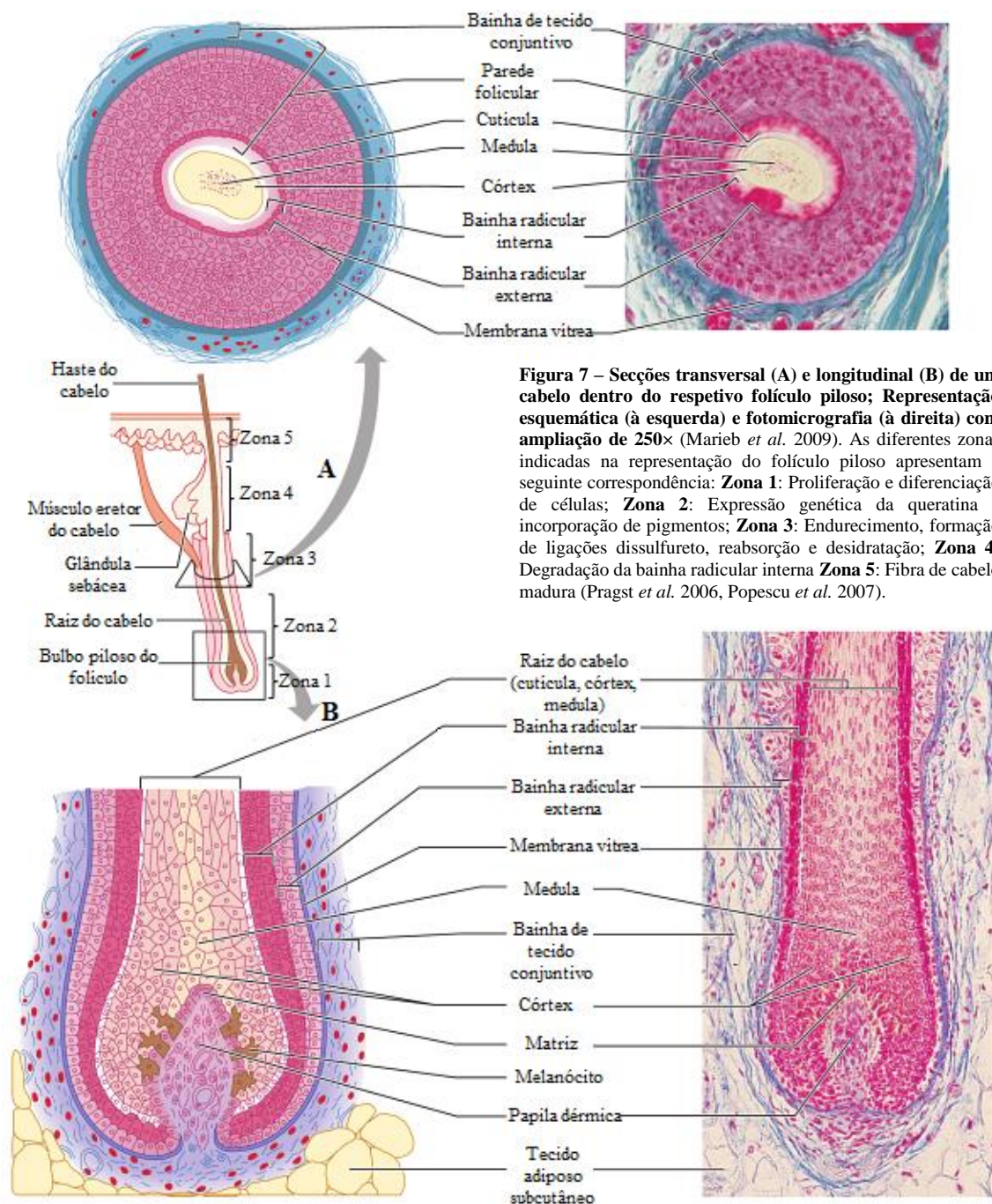
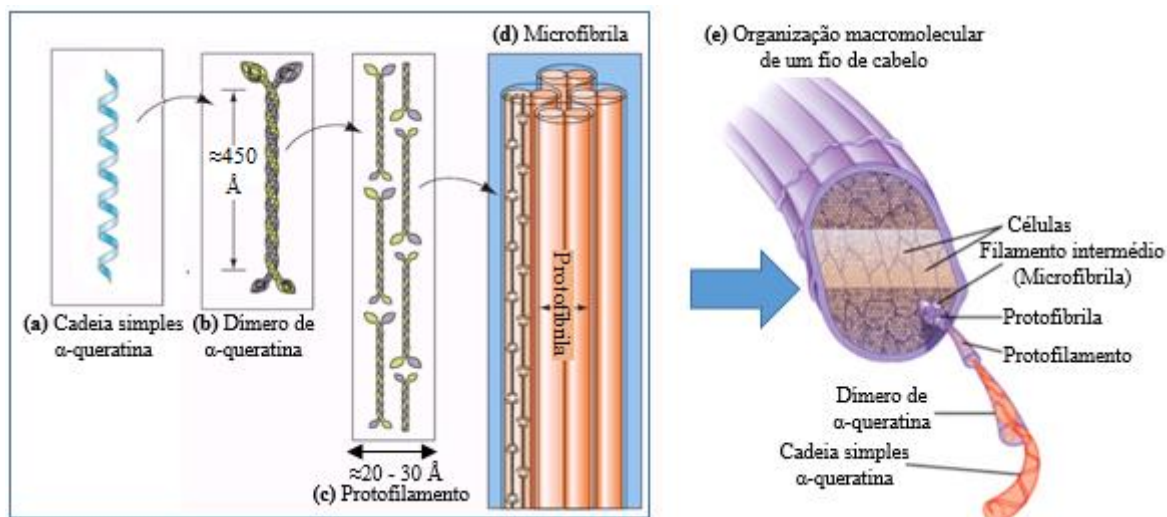


Figura 6 – Imagens obtidas por microscopia eletrónica de uma fibra de cabelo e das suas principais estruturas constituintes [8]



Do ponto de vista químico, um fio de cabelo é uma rede polimérica parcialmente cristalina de estruturas cilíndricas compactadas (**Figura 8**), envolvendo ligações químicas cruzadas, que contém vários tipos de grupos químicos funcionais (ácidos e básicos) com potencial para se ligarem quimicamente a pequenas moléculas ou a metais (Harkey 1993, Popescu *et al.* 2007).





**Figura 8 – Modo de agrupamento de cadeias de queratina que formam a fibra de cabelo.** (a) Cadeia simples de  $\alpha$ -queratina (com enrolamento dextrogiro); (b) Dímero de  $\alpha$ -queratina: Duas cadeias simples, uma do tipo I (acídica) e outra do tipo II (básica) agrupam-se para formar um (hetero)dímero de  $\alpha$ -queratina, que corresponde a uma dupla hélice (com enrolamento levogiro); (c) Protofilamento: Filamentos antiparalelos de dímeros de  $\alpha$ -queratina associados de forma “cabeça-cauda”; (d) Microfibrila: A dimerização dos protofilamentos origina uma protofibrila; tetrameros de protofibrilas originam uma microfibrila; (e) Organização macromolecular da fibra: As microfibrilas agrupam-se para formar agregados macromoleculares ainda mais complexos, mas a caracterização desse tipo de estruturas ainda é pobre, embora se pense que tenham uma forma helicoidal (Voet *et al.* 2010, Nelson *et al.* 2013).

O cabelo contém uma grande quantidade de uma família de proteínas muito ricas em enxofre (que corresponde a cerca de 5% da massa total do cabelo): a queratina. O elevado conteúdo de enxofre nesse tipo de proteínas é explicado pela abundância de cisteína e cistina na sua cadeia polipeptídica (Vogt *et al.* 2008). Esse tipo de proteínas forma longas fibras, que são mantidas juntas através da substituição de grupos tiol (-SH) por ligações dissulfureto (S-S). A formação de ligações dissulfureto entre as fibras de queratina, aliada à formação de ligações químicas cruzadas com outras proteínas, resulta na elevada resistência e estabilidade do cabelo (Harkey 1993).

Dependendo do seu teor de humidade, o cabelo humano consiste em 65-95% de proteínas, 1-9% de lípidos, e ainda pigmentos e elementos vestigiais (<1%). Os elementos vestigiais combinam-se quimicamente com cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas ou com os grupos ácidos dos lípidos (Harkey 1993, Robbins 2012b).

Os lípidos nos cabelos estão presentes tanto internamente, nomeadamente na “cola” que mantém juntas as células do córtex, como à superfície do fio, adsorvidos às células da cutícula, contribuindo para o carácter parcialmente hidrofóbico do cabelo. A ligação de lípidos às fibras de cabelo pode ocorrer tanto por intermédio de forças de ligação fracas, tais como ligações de Van der Waals, como por intermédio de ligações covalentes (Robbins 2012b). O lípido superficial mais comum é o ácido 18-metilicosanóico, que se liga à cutícula por ligações tioéster. Ao contrário do que se poderia pensar intuitivamente, o ácido 18-

metilicosanóico não provém das secreções produzidas pelas glândulas sebáceas, mas sim das células em desenvolvimento na base do folículo, tal como demonstrado por Peet (1994) (Jones *et al.* 1997).

Devido ao elevado número de reações químicas às quais os cabelos podem ser sujeitos, resultante de tratamentos capilares (permanentes, alisamentos, pinturas, etc.) e/ou à exposição prolongada à radiação solar, muitos tipos de alterações estruturais podem ocorrer. São exemplo de alterações estruturais do cabelo a fragmentação das cadeias proteicas existentes nas fibras e a derivação dos aminoácidos, o que poderá alterar significativamente o comportamento físico e químico do cabelo (Robbins 2012b).

Embora as características do couro cabeludo dependam de vários fatores, é possível estabelecer valores de referência que traduzem as características capilares da maioria da população humana (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Valores de referência para algumas das principais características do couro cabeludo humano (Harkey 1993) [8]

Valores de referência	Características
<b>58 a 100 µm</b>	<b>Diâmetro de um fio de cabelo.</b> Nota: como a secção transversal de um fio de cabelo apresenta um perfil elíptico, o uso do termo “diâmetro” não descreve exatamente a espessura do fio.
<b>120000-150000</b>	<b>Número total de cabelos existentes em couros cabeludos saudáveis</b>
<b>250</b>	<b>Número médio de cabelos por cm<sup>2</sup> do couro cabeludo.</b> Este número varia ( $\pm 50$ ) consoante a zona do couro cabeludo considerada.
<b>1,3 g</b>	<b>Massa de 1 cm<sup>3</sup> de cabelo</b>
<b>30% da sua massa total</b>	<b>Percentagem de água que um fio de cabelo pode absorver.</b> No caso de cabelos danificados, a percentagem indicada pode atingir 45%.
<b>1 cm</b>	<b>Crescimento mensal de cada fio de cabelo.</b> Este valor corresponde a um valor médio simplificado, sendo referidos na literatura valores para este parâmetro entre 0,6 e 3,6 cm.
<b>50-100</b>	<b>Número de fios de cabelo perdidos diariamente, de forma natural</b>

O folículo piloso pode ser dividido, de forma aproximada, em cinco zonas distintas, de acordo com o que é apresentado na **Figura 7** (Pragst *et al.* 2006, Popescu *et al.* 2007). Na zona 1, a base do bolbo piloso, localizada 3 a 5 mm abaixo da superfície da pele, ocorre a proliferação (mitose), diferenciação celular e transferência de substâncias químicas para a fibra de cabelo, a partir da corrente sanguínea (Pragst *et al.* 2006, Popescu *et al.* 2007, Robbins 2012c). O centro de germinação em torno da papila dérmica da base do bolbo piloso é constituído por queratinócitos e melanócitos, que produzem, respetivamente, queratina e melanossomas. Os melanossomas são organelos citoplasmáticos responsáveis pela síntese, armazenamento e transporte de melanina (pigmento) para os queratinócitos (Karen *et al.* 2006, Pragst *et al.* 2006).

A quantidade e o tipo de melanina existente no cabelo são fatores controlados geneticamente e traduzem-se em diferentes cores de cabelo. Os tipos de melanina existentes são a eumelanina, feomelanina e formas degradadas de cada uma destas. Os cabelos mais escuros (pretos e castanhos) contêm uma maior quantidade de eumelanina intacta; à medida que a cor destes se torna mais clara, verifica-se que a quantidade da forma degradada da eumelanina aumenta. Por isso, cabelos com altos conteúdos dessa forma degradada são loiros. Os cabelos ruivos são mais ricos em feomelanina e na respetiva forma degradada (Prota 2000). As estruturas da eumelanina, feomelanina e respetivos produtos de degradação não são ainda bem conhecidas, existindo várias propostas na literatura (Robbins 2012a). A pigmentação do cabelo influencia a incorporação de substâncias químicas nessa matriz, nomeadamente metais, tal como referido em Hong *et al.* (2007) e Tobin (2008).

A rápida mitose na zona 1 empurra as células formadas em direção à superfície do folículo, fazendo-as passar pela zona 2, onde ocorre a expressão genética da queratina, formando-se filamentos proteicos que se fundem e preenchem as células. À medida que as células percorrem o folículo, as transformações que sofrem são diferentes no córtex e na cutícula: no primeiro caso, as células passam de uma forma aproximadamente esférica, que se verifica na zona germinativa do folículo, para a forma de um fuso (fusiforme), enquanto no segundo caso as células adquirem um formato final semelhante ao de uma telha (Pragst *et al.* 2006).

A zona 3 é aquela onde a fibra de cabelo adquire o seu diâmetro final, devido à desidratação, e cessa a síntese proteica, o que é explicado pela ausência de ácido ribonucleico (RNA) (Odland 1953). Nessa zona, e ainda ao longo das zonas 4 e 5, ocorre o endurecimento progressivo da fibra de cabelo, através de um processo de queratinização (Popescu *et al.* 2007). A queratinização, ou cornificação, é um processo de morte celular, que difere da apoptose, pois as células mortas não são completamente eliminadas pelo organismo, mas sim acumuladas, para cumprirem uma determinada função. Um exemplo é a criação da barreira protetora da pele através da acumulação de corneócitos (células mortas correspondentes ao estado de diferenciação terminal dos queratinócitos) (Lippens *et al.* 2005). A queratinização ocorre com a produção desmedida de queratina pelos queratinócitos, que preenche o citoplasma, destruindo os organelos e impedindo o normal funcionamento do metabolismo celular, o que leva à morte da célula (Pragst *et al.* 2006, Sperling *et al.* 2012). A queratina do cabelo (queratina dura) distingue-se da queratina da epiderme

(queratina mole), devido à maior quantidade total de cisteína na primeira, o que se traduz numa maior quantidade total de enxofre (Yu *et al.* 1993).

O crescimento das fibras de cabelo ocorre num ciclo envolvendo três fases principais, cujas características são apresentadas a seguir (Robbins 2012c):

1. Anagénesse – Fase do crescimento da fibra, que se caracteriza por uma intensa atividade metabólica no bolbo piloso. Esta fase prolonga-se, geralmente, durante 2 a 6 anos.
2. Catagénesse – Fase com duração de algumas semanas, durante as quais ocorre um decréscimo na atividade metabólica do bolbo piloso, o que leva à apoptose programada das células aí existentes. Verifica-se a migração do bolbo em direção à superfície da epiderme, iniciando-se um processo de atrofia do folículo.
3. Telogénese – Fase com duração de algumas semanas (geralmente, 4 a 8) em que o crescimento fio de cabelo é completamente cessado. O folículo piloso atrofia de tal forma que o bolbo aproxima-se do nível da glândula sebácea.

O início de um novo ciclo de crescimento de cabelo ocorre com a proximidade do bolbo piloso atrofiado a um depósito de células estaminais (na zona de contacto do músculo eretor com o folículo), o que ativa o crescimento de uma nova fibra (Karen *et al.* 2006, Robbins 2012c). O crescimento dessa fibra de cabelo conduz à expulsão da antiga fibra e à regeneração de todo o folículo, reentrando-se assim na anagénesse. Por vezes, decorre um certo período de tempo entre a expulsão de uma fibra do folículo (final da telogénese) e o início da anagénesse, o que resulta numa alopecia sazonal (Robbins 2012c). Note-se que a fase mais prolongada do ciclo do cabelo é a anagénesse, sendo nesta que existe a incorporação de substâncias químicas na fibra a partir dos vasos sanguíneos envolventes. Cerca de 85% dos folículos existentes no couro cabeludo saudável encontram-se em catagénesse, enquanto os restantes 15% em telogénese (Pragst *et al.* 2006). Contaminações com níveis elevados de metais tóxicos, tais como Tl, Cd e Hg podem acelerar a transição da anagénesse para a catagénesse (Pozebon *et al.* 1999).

### **2.1.2. Perspetiva histórica da análise toxicológica de cabelo**

A análise de cabelo para fins toxicológicos tem adquirido um maior interesse na última década, principalmente no diagnóstico do consumo de drogas de abuso. Contudo, o uso de cabelo como amostra toxicológica não é recente (Jiménez *et al.* 2009).

O primeiro registo escrito de um trabalho de análise química de cabelos corresponde a um estudo efetuado por Hoppe-Seyer, publicado em meados do século XIX, no

“*Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizin*” (“Manual Prático de Medicina Legal”), do patologista forense alemão Johann Ludwig Casper (Casper 1857-1858)<sup>1</sup>. Nesse trabalho, determinou-se arsénio (As) em cabelos de um cadáver exumado após 11 anos de sepultamento (Moeller *et al.* 1996, Sachs 1997). Passados quase 100 anos, em 1954, foi publicado um trabalho referente à determinação de barbitúricos em pelo do porquinho-da-índia (Goldblum *et al.* 1954), naquela que é atualmente a revista científica com maior visibilidade na área da dermatologia (Moeller *et al.* 1996, Sachs 1997).

Na década de 1970, a toxicologia analítica desenvolveu-se significativamente, devido à evolução das técnicas analíticas existentes e ao surgimento de técnicas inovadoras (nomeadamente as técnicas de ICP). A aplicação de algumas dessas técnicas a matrizes biológicas permitiu avanços significativos em termos de deteção e quantificação. Nesta conjuntura, o potencial do cabelo como matriz analítica começou a ser explorado mais intensivamente por muitos investigadores (Sunshine 1996).

Em 1980, foi publicado um trabalho que reconheceu a absorção atômica como uma técnica com a capacidade de detetar elementos em quantidades vestigiais nos cabelos (Chatt *et al.* 1980). Nesse trabalho foi introduzida a hipótese do cabelo ser uma matriz preferível, relativamente ao sangue e à urina, para a avaliação de riscos de exposição ambiental. Esse grupo de investigadores referiu que o cabelo poderia armazenar substâncias por um período de tempo prolongado. Por conseguinte, a análise da totalidade ou de segmentos dos fios de cabelo poderia fornecer dados objetivos quanto à extensão da exposição de um indivíduo a um determinado contaminante e ao potencial dano que essa exposição poderia originar. Neste contexto, Pb, As, Hg e Cd foram alguns dos primeiros metais (tóxicos) a serem estudados em cabelo, com diferentes graus de sucesso (Sunshine 1996).

O potencial da análise de cabelo despertou o interesse de alguns médicos, que começaram a sugerir a existência de uma relação direta entre a quantidade de determinados elementos químicos nos cabelos, a inteligência, a capacidade de aprendizagem e a manifestação de doenças mentais (Barlow *et al.* 1980, Phil *et al.* 1980). No entanto, no final da década de 1970, já tinha sido obtida experiência suficiente que permitisse rejeitar esta prática, apesar dos extensos, mas mal sucedidos, esforços para justificá-la (Sunshine 1996).

Provavelmente, a aplicação mais popular da análise de elementos químicos em cabelo, mas também a mais controversa, é a avaliação de deficiências nutricionais. Muitos

---

<sup>1</sup>Na literatura são referidos os anos de 1857 e 1858, não existindo ainda um consenso entre os vários autores.



investigadores, farmacêuticos, médicos e nutricionistas começaram a defender a hipótese do estado nutricional de um indivíduo estar refletido na concentração de vários elementos nos seus cabelos. Neste contexto, assistiu-se a um grande aumento na procura de serviços de análise de cabelo. Muitos laboratórios, alguns com competência duvidosa, procuraram satisfazer a crescente demanda por serviços de análise de cabelo, mas começou a surgir alguma controvérsia em torno desse tipo de serviços (Sunshine 1996). Essa controvérsia refletiu-se na publicação de vários artigos a partir de meados da década de 1970 e, principalmente, durante a década de 1980, como são exemplo os trabalhos de Lazar (1974), Hambidge (1982), Rivlin (1983), Barrett (1985) e Klevay *et al.* (1987).

No trabalho de Barrett (1985), foram enviadas amostras de duas adolescentes saudáveis para vários laboratórios comerciais, verificando-se que os níveis relatados para a maioria dos elementos químicos variavam consideravelmente entre amostras supostamente idênticas enviadas para um mesmo laboratório e entre diferentes laboratórios. Para além disso, os relatórios fornecidos pelos laboratórios também não estavam de acordo relativamente aos níveis de concentração considerados “normais” para vários elementos no cabelo. A maioria dos relatórios continha ainda interpretações dos resultados potencialmente assustadoras para os pacientes, e os que incluíam recomendações para uso de suplementos não estavam de acordo relativamente aos tipos e às quantidades que deveriam ser usadas. Estes trabalhos conduziram à conclusão de que a análise elementar do cabelo, da forma que era executada na época, não tinha validade científica, constituía um desperdício económico e tinha inclusivamente alguns contornos de ilegalidade. Embora o trabalho de Barrett (1985) apresente algumas falhas, nomeadamente quanto à amostragem do cabelo, tal como indicado por Walsh (1986), a maioria objeções à análise de cabelo são válidas, sendo consensual que ocorriam abusos por parte dos laboratórios que comercializavam serviços de análise química de cabelo (Walsh 1986, Kintz 1996).

Um trabalho análogo ao de Barrett (1985) foi realizado por Seidel *et al.* (2001), conduzindo ao mesmo tipo de conclusões, o que desencadeou uma troca de críticas entre o primeiro autor desse estudo e representantes de alguns dos laboratórios comerciais avaliados (Kaminski *et al.* 2001, Seidel 2001, Watts *et al.* 2001). Mais recentemente, Namkoong *et al.* (2013) realizaram também um estudo semelhante, verificando um grau de concordância razoável entre os valores de concentração obtidos por diferentes laboratórios; porém um grau

de discordância significativo quanto aos intervalos de valores considerados pelos laboratórios como valores normais de concentração.

Insatisfeitos com a sua experiência na análise de metais vestigiais em cabelo, Baumgartner *et al.* (1979) aplicaram um radioimunoensaio à detecção de morfina em pelos de ratos e em cabelos de humanos consumidores de heroína. Esse trabalho, em conjunto com outros trabalhos desenvolvidos por Arnold *et al.* (1981), Smith *et al.* (1981), Valente *et al.* (1981), Suzuki *et al.* (1984), confirmaram o valor do cabelo na avaliação do consumo de drogas orgânicas. Esses trabalhos pioneiros tiveram um impacto significativo na comunidade científica, originando um interesse crescente relativamente à utilidade da análise química do cabelo e à validade desse tipo de procedimento analítico (Sunshine 1996, Sachs 1997).

Atualmente, a validade da análise de cabelo para avaliação do consumo de drogas orgânicas parece ser mais consensual que o uso dessa matriz para avaliação da exposição a determinados elementos químicos. Assim, verifica-se que a principal área de aplicação do cabelo como matriz analítica é a avaliação da exposição, passiva ou ativa, a drogas orgânicas, considerando vários contextos: exposição pré-natal, controlo *antidoping*, abuso sexual facilitado pelo consumo de drogas, abuso de álcool, etc. Vários artigos científicos demonstram a aplicabilidade do cabelo nos diferentes contextos indicados (Barbosa *et al.* 2013). O crescente interesse no potencial analítico do cabelo para a avaliação da exposição a drogas orgânicas culminou na criação da *Society of Hair Testing* em 1995. Essa instituição internacional organiza encontros anuais e ocasionalmente *workshops*, para difundir e debater o uso de cabelo para fins analíticos, e tem vindo ainda a organizar ensaios de comparação interlaboratorial (ECI), para análise de drogas orgânicas em cabelo e a divulgar vários relatórios e diretrizes que apoiam a realização diária de análises de cabelo em vários laboratórios por todo o mundo (Agius 2014).

Embora a validade da quantificação de elementos químicos no cabelo não tenha ainda o reconhecimento verificado para as drogas orgânicas, nas últimas décadas tem-se procurado garantir a qualidade dos resultados produzidos na análise elementar de cabelo. Neste contexto, em 1982, a IAEA (*International Atomic Energy Agency*) produziu o primeiro material de referência (MR) para um estudo interlaboratorial de análise elementar em cabelo (M'Baku *et al.* 1982). Desde aí, vários organismos internacionais têm vindo a produzir materiais de referência certificados (MRC) para a análise elementar em cabelo (Goullé

2006). Existe ainda, desde 1996, um programa de ensaios de comparação interlaboratorial, coordenado por uma organização canadiana, designado por QMEQAS, para a quantificação de vários elementos químicos em cabelo [9].

Desde meados do século XX, foram realizados vários trabalhos de quantificação de elementos metálicos tóxicos em amostras de cabelo de várias personalidades históricas, o que permitiu compreender alguns dos problemas de saúde verificados durante as suas vidas (Shamberger 2002, Chojnacka *et al.* 2012). Contudo, existe alguma controvérsia em torno dos resultados obtidos nesses trabalhos (Hindmarsh *et al.* 2002, Lugli *et al.* 2005, Eisinger 2007, Hindmarsh *et al.* 2008). Algumas das personalidades históricas das quais foram obtidas amostras de cabelo incluem: Napoleão Bonaparte (Forshufvud *et al.* 1961, Weider *et al.* 1999, Lin *et al.* 2004, Kintz *et al.* 2006), Ludwig van Beethoven (Eisinger 2007, Reiter 2007), Charles Hall (Paddock *et al.* 1970) e Andrew Jackson (Deppisch *et al.* 1999).

No caso de Napoleão, um dos casos mais célebres, existem relatos históricos de que após o seu exílio na ilha de Santa Helena, este começou a revelar alguns sintomas que podem ser associados ao envenenamento com arsénio (As) (Shamberger 2002, Chojnacka *et al.* 2012). Em vários estudos científicos (Forshufvud *et al.* 1961, Smith *et al.* 1962, Forshufvud *et al.* 1964, Weider *et al.* 1999, Lin *et al.* 2003, Kintz *et al.* 2006), verificou-se um alto nível de As nos cabelos do imperador francês, o que sustenta a hipótese de envenenamento com esse elemento. Contudo, as conclusões obtidas na análise dos cabelos dessa personalidade histórica são controversas, existindo a forte possibilidade de que o As detetado possa provir de fontes externas. Para além da quantidade massiva de As nos cabelos de Napoleão, foram ainda detetadas grandes quantidades de mercúrio (Hg) e antimónio (Sb), o que está de acordo com a informação conhecida de que Napoleão terá sido sujeito a tratamentos com cloreto de mercúrio (calomelano) e tartarato de antimónio (Kintz *et al.* 2006).

Durante a pesquisa bibliográfica realizada no contexto deste trabalho, verificou-se que o número de publicações relacionadas com a quantificação de elementos químicos em cabelo humano tem tido uma tendência claramente crescente, o que pode ser explicado, em parte, pela inexistência de consenso relativamente às conclusões obtidas nos trabalhos publicados. A discrepância existente entre os resultados indicados em diferentes artigos científicos deve-se, principalmente, à dificuldade em distinguir o tipo de contaminações no cabelo, endógenas e exógenas, e aos diferentes procedimentos de recolha e preparação de amostras. Para além disso, muitos outros fatores que não podem ser controlados, por serem

inerentes à própria matriz, concorrem para a obtenção de resultados discrepantes. Os principais problemas analíticos atuais em termos de quantificação de elementos em cabelos não estão associados às técnicas instrumentais existentes, mas sim à falta de procedimentos normalizados e a deficiências em termos de práticas de controlo/garantia da qualidade (Pozebon *et al.* 1999). Assim, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos constituem parte do trabalho necessário para tornar a análise elementar de cabelo um processo viável e com utilidade prática para várias aplicações, aproveitando as vantagens inerentes a este tipo de matriz.

### 2.1.3. Vantagens e desvantagens do cabelo como matriz analítica

O corpo humano tem uma capacidade notável de depuração, possuindo mecanismos de excreção que permitem eliminar substâncias químicas indesejáveis. Assim, a exposição recente a um determinado contaminante pode ser detetada, de forma relativamente simples, em fluidos biológicos, nomeadamente sangue, suor, saliva e urina. Por outro lado, a deteção de contaminações que não sejam recentes é muito difícil com o tipo de matrizes referido, sendo precisamente para análises com esse objetivo que o cabelo constitui uma matriz analítica muito interessante, devido às suas características únicas.

O corpo humano não possui qualquer mecanismo natural conhecido de eliminação de substâncias químicas depositadas no cabelo. Para além disso, devido à sua elevada resistência, a degradação natural do cabelo é difícil. Assim, o grau de acumulação de substâncias excretadas pelo organismo no cabelo pode ser várias vezes superior ao que se verifica para outras matrizes biológicas, tal como é demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Comparação da concentração média de vários elementos em cabelo (µg/g) e no sangue (mg/L) (Rodushkin *et al.* 2000)

Razão de concentração no cabelo/concentração no sangue	Elementos
<1	Fe, Rb, Na, Cl, Cs, P, K
1-10	Mg, Ba, Br, Se, Li, Ca, I, Hf
10-100	Si, Be, Th, Tl, Re, Zn, Cu, Pt, Ir, Mo, Zr, As, Mn, Sc, Nb, Pb, B, Sb, Sr, Ga
100-1000	Ta, Hg, Co, W, Ni, Y, Al, Cr, Cd, Sn, V, Ti, Terras raras
>1000	Au, Bi, Ag, U

As características do cabelo, dependendo da perspetiva em que são encaradas, podem constituir tanto vantagens como desvantagens. Por exemplo, o facto de o cabelo estar na parte exterior do corpo humano torna a sua recolha muito fácil, o que constitui um aspeto vantajoso, mas também aumenta a sua suscetibilidade a contaminações externas, o que constitui uma desvantagem. Assim, se determinadas substâncias químicas forem

incorporadas no cabelo exclusivamente por ingestão, poderão ser detetadas por longos períodos de tempo (ampla “janela de detecção”) e a sua concentração terá significado no contexto da avaliação do que foi ingerido pelo indivíduo durante um intervalo de tempo definido. Por outro lado, se as substâncias químicas consideradas se ligarem ao cabelo, mesmo de forma parcial, através de outros mecanismos, tais como exposição accidental (passiva), então poderá ser difícil proceder à sua remoção e à sua distinção das substâncias que foram incorporadas ativamente (através da ingestão).

Algumas das vantagens do uso de cabelo como matriz analítica são (Jenkins 1979, Pozebon *et al.* 1999, Pragst *et al.* 2006, Antunes *et al.* 2009, Chojnacka *et al.* 2012, Barbosa *et al.* 2013):

- Permite estudos retrospectivos;
- Recolha indolor, não embaraçosa nem invasiva;
- Maior “janela de detecção” (até anos) relativamente a outras matrizes biológicas;
- Recolha, armazenamento, manuseamento e conservação da amostra bastante simples, não requerendo refrigeração e/ou uso de conservantes;
- Permite a realização de análises *post-mortem*;
- Permite a distinção entre exposições agudas e crónicas;
- Permite avaliar variações nos comportamentos/hábitos do dador;
- Possibilidade de obter facilmente novas amostras com características próximas das recolhidas originalmente;
- Dificuldade de adulteração intencional da concentração de determinadas substâncias químicas nessa matriz;
- Elevada acumulação de substâncias, o que torna a sua detecção mais fácil com as técnicas analíticas existentes.

Por outro lado, algumas das desvantagens do uso de cabelo como matriz analítica são (Jenkins 1979, Barbosa *et al.* 2013):

- Suscetibilidade a contaminações externas, o que poderá originar falsos positivos;
- Tratamentos capilares que alterem a estrutura do cabelo podem originar a remoção de determinadas substâncias químicas do cabelo, originando falsos negativos;
- Grande variabilidade de características entre diferentes indivíduos;
- Necessidade de eliminar contaminações com um processo de lavagem, o que pode criar problemas de interpretação e comparabilidade dos resultados;

➤ Inadequado para avaliação da exposição recente a um determinado contaminante, devido ao tempo que decorre desde a transferência desse contaminante da corrente sanguínea para a fibra de cabelo, até à saída da porção contaminada do interior do folículo.

#### 2.1.4. Incorporação e análise de elementos metálicos em cabelos

A maioria dos elementos da tabela periódica tem carácter metálico e é geralmente a estes que estão associados problemas de saúde nos humanos. Assim, os trabalhos científicos referentes à análise elementar em cabelos focam-se geralmente na quantificação desse tipo de elementos, principalmente aqueles que apresentam altos níveis de toxicidade, nomeadamente Hg, As, Cd e Pb (Goullé 2006).

A exposição a metais tóxicos é uma das preocupações atuais, pois acarreta graves problemas em termos de saúde pública. Esse tipo de elementos químicos afeta os ecossistemas em geral, mas principalmente os humanos, uma vez que, por se encontrarem no topo da cadeia alimentar, estes são uma das espécies mais afetadas pelos efeitos de bioacumulação e bioampliação (Mahmood *et al.* 2012). Neste contexto, o foco do trabalho apresentado será também a quantificação de elementos metálicos em cabelo, embora a técnica analítica usada tenha potencial para quantificar alguns elementos não-metálicos.

Os estudos apresentados na literatura científica indicam que a concentração total de elementos metálicos em cabelo é normalmente inferior a 1% (Robbins 2012b). Por exemplo, em Pautard (1963) é indicado um teor de cinzas (resíduo inorgânico) mássico de 0,26% em cabelo humano seco, enquanto em Dutcher *et al.* (1951) são reportados valores entre 0,55% e 0,94% (dependendo da cor do cabelo). Os mecanismos de incorporação de substâncias químicas no cabelo ainda não estão completamente definidos, mas na **Figura 9** são apresentadas algumas das vias de incorporação propostas. Relativamente à incorporação endógena (interna), o modelo mais simples assume que esta ocorre de

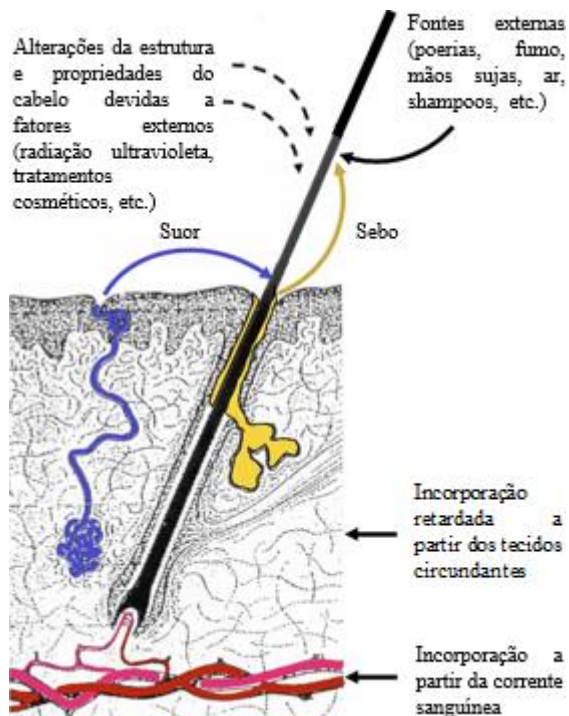


Figura 9 – Alguns dos fatores que influenciam o grau de incorporação de substâncias químicas em cabelos (Pragst *et al.* 2006)

forma passiva, ou seja, com base em gradientes de concentração entre a fibra de cabelo e os fluidos circundantes (sangue, linfa e outros tipos de fluido extracelular), numa extensão de 1,2 a 1,5 mm entre a base do folículo e a zona de queratinização (Pragst *et al.* 2006). Quanto à contaminação exógena (externa), esta pode ocorrer de várias formas, envolvendo, entre outros fatores, o ambiente externo e a deposição de suor e sebo na superfície do cabelo. Este mecanismo de incorporação envolvendo várias rotas foi demonstrado por Henderson (1993) para drogas orgânicas, mas é também aplicável a substâncias inorgânicas, nomeadamente elementos metálicos, embora o número de fontes externas de elementos metálicos seja superior ao de drogas orgânicas (Goullé 2006, Pragst *et al.* 2006).

As substâncias químicas podem associar-se ao cabelo através da criação de ligações covalentes com queratina, melanina e/ou lípidos, mas também através de interações eletrostáticas. Alguns elementos vestigiais transportados por poeiras acabam por ser adsorvidos nos espaços entre as células da cutícula, principalmente quando esta estiver danificada (Pozebon *et al.* 1999). O número de eletrões na camada eletrónica mais externa e o tamanho de cada elemento ditam o tipo e a força da ligação estabelecida com o cabelo. No trabalho desenvolvido por Hinnens *et al.* (1974) é feito um estudo da eficiência de extração de metais ligados a cabelo, verificando-se que os elementos com a camada de valência completa (exemplos:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ ) parecem ser mais fáceis de extrair comparativamente a elementos com camadas de valência parcialmente preenchidas. Essa observação pode ser explicada por uma maior força da ligação entre o metal e o cabelo no caso em que o elemento possui a sua camada de valência parcialmente preenchida. A adsorção de vários metais ao cabelo é dependente do pH da fibra de cabelo e do meio envolvente, o que é sugestivo de que o cabelo funciona como um permutador de iões (catiões) (Mikasa *et al.* 1988). A maioria dos metais apresenta uma grande afinidade por grupos tiol, possuindo, por isso, uma grande afinidade pelas fibras de cabelo (Bush *et al.* 1995). Contudo, vários investigadores sugerem que os grupos carboxilo são também relevantes na ligação de elementos metálicos às fibras de cabelo (Mikasa *et al.* 1988).

As técnicas mais usadas atualmente para a análise elementar de cabelo são as técnicas de espectrofotometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-OES), espectrometria de massa com plasma induzido (ICP-MS), absorção atômica com câmara eletrotérmica (ETA) e absorção atômica de chama (FAA), pois cumprem normalmente de forma satisfatória os objetivos desse tipo de análise. Quanto ao tratamento prévio da amostra para a análise com

essas técnicas, o uso de métodos de digestão ácida assistida por micro-ondas é amplamente aceite (Chojnacka *et al.* 2012).

A interpretação de resultados e os processos de amostragem e preparação de amostras constituem os principais problemas dos trabalhos referentes à análise química de cabelo. Esses problemas estão relacionados com os vários fatores que podem influenciar a concentração de elementos no cabelo e com a capacidade de diferenciar as incorporações endógena e exógena dos elementos nessa matriz (Chojnacka *et al.* 2012). A capacidade de diferenciação das contaminações endógena e exógena constitui um aspeto muito importante da análise elementar de cabelos, pois pretende-se normalmente que as concentrações determinadas sejam representativas da ingestão (incorporação endógena), sem que exista uma contribuição significativa de fontes externas. O impacto das contaminações externas na quantificação de metais em cabelos é particularmente acentuado no caso em que os analitos são elementos vestigiais. Assim, é imperativo que as substâncias provenientes do ambiente externo sejam removidas, antes de se proceder à análise. Se essa remoção prévia não for possível, deverá procurar-se uma forma de quantificar a fração de analito proveniente de fontes externas. São vários os procedimentos de extração e lavagem elaborados por diferentes laboratórios e/ou investigadores, o que torna a comparação de resultados muito difícil. Para além disso, não é fácil avaliar e garantir a seletividade desses procedimentos, de maneira a que seja possível diferenciar as incorporações endógena e exógena do analito.

A eliminação de contaminações exógenas é uma etapa crucial nos procedimentos de análise elementar em cabelo; por isso, existem várias publicações onde são comparados e avaliados alguns dos métodos de lavagem aplicados normalmente. Uma compilação de alguns desses procedimentos é apresentada na secção de Anexos deste documento. Apesar da grande variabilidade de procedimentos de lavagem existentes, estes podem ser agrupados em cinco categorias de solventes (Shamberger 2002): água ultrapura, solventes orgânicos (geralmente, metanol e acetona), detergentes iónicos (geralmente, dodecilsulfato de sódio), detergentes não-iónicos (geralmente, Triton X-100) e agentes quelantes (geralmente, EDTA). O método de lavagem mais usado é o recomendado pela IAEA (Ryabukhin 1976, Cortes Toro *et al.* 1993), o único procedimento que pode ser classificado como padrão (Bencko 2005). Esse procedimento envolve lavagens sucessivas com água ultrapura e acetona. Apesar de ser o método de lavagem de cabelo mais usado para a quantificação de metais, alguns artigos científicos apresentam objeções relativamente à aplicação desse



procedimento na quantificação de determinados elementos metálicos. Essas objeções devem-se ao facto de nem sempre o método proposto pela IAEA remover uma quantidade significativa de metal, tal como demonstrado por Morton *et al.* (2002), e pela danificação causada pela acetona na cutícula (Raposo *et al.* 2014) que promove a extração de elementos incorporados endogenamente.

Embora muitos laboratórios adotem condutas de garantia da qualidade, validando os seus procedimentos de análise elementar em cabelos, esta validação limita-se, quase sempre, à técnica instrumental de análise usada, que, normalmente, é a menor fonte de erros no processo analítico global. Portanto, a variabilidade associada às etapas de amostragem e tratamento prévio da amostra não é geralmente incluída nos procedimentos de validação executados, o que confere uma menor credibilidade aos resultados obtidos (Chojnacka *et al.* 2012). Considerando a dificuldade em definir o procedimento de lavagem mais adequado para a quantificação de um determinado analito é frequente a opção de não incluir a lavagem no processo de validação. Por esse motivo, alguns autores defendem procedimentos de análise de cabelo que não envolvam qualquer etapa prévia de lavagem, tal como é indicado por Chittleborough (1980). Este procedimento é adotado principalmente pelo facto da variabilidade dos resultados obtidos por diferentes laboratórios para uma mesma amostra de cabelo ser inferior, quando o procedimento analítico não envolve a lavagem da amostra. A abordagem analítica que exclui a lavagem da amostra de cabelo pode ter interesse, nomeadamente do ponto de vista forense, uma vez que poderá pretender-se determinar apenas a composição elementar global, constituindo esta uma forma de identificação do indivíduo. Para os casos em que a concretização do objetivo da análise à amostra de cabelo está dependente da influência das contaminações externas, os defensores dos procedimentos sem etapas de lavagem propõem que sejam usadas amostras sujeitas a um mínimo de contaminação externa. Neste contexto, o tipo ideal de amostra seriam pelos que estivessem confinados unicamente ao interior do folículo. Como é inviável obter esse tipo de amostras porque seria necessário arrancar os pelos, poderão ser usadas fibras que tenham permanecido num curto espaço de tempo no exterior da pele, não estando, por isso, sujeitas de forma significativa a contaminações externas. Um exemplo de um tipo de amostra que cumpre esses requisitos são os pelos da barba recente, existindo alguns trabalhos publicados de quantificação de metais nesse tipo de matriz (Rabinowitz *et al.* (1976) e Chittleborough *et al.* (1980)).

Para além dos problemas associados à variabilidade de técnicas analíticas e dos métodos de recolha e preparação de amostras, vários outros fatores dificultam a interpretação da análise de elementos químicos em cabelo, nomeadamente sexo, idade, etnia, hábitos tabagísticos, exposição ambiental, exposição ocupacional, implantes metálicos, patologias e tratamentos capilares (Goullé 2006, Chojnacka *et al.* 2012). Em vários trabalhos publicados procurou-se estabelecer relações entre alguns desses fatores e as concentrações de metais em cabelo. Goullé (2006) apresenta uma revisão de alguns desses trabalhos. Existem contudo algumas contradições nas conclusões desses trabalhos, o que dificulta a clara identificação da influência de cada fator na concentração de um determinado elemento no cabelo.

Para a comparação e interpretação dos resultados obtidos na análise elementar em cabelo, seria importante definir intervalos de referência para a concentração dos vários elementos químicos no cabelo. Embora existam algumas publicações onde são apresentados intervalos de referência, existe uma grande variação dos valores indicados nesses trabalhos (Goullé 2006, Antunes *et al.* 2009). Essa variação deve-se aos fatores já referidos, nomeadamente as variações nos procedimentos analíticos usados, as diferenças nas características das populações estudadas e a variabilidade inerente ao cabelo como matriz analítica. Na secção de Anexos, são apresentadas tabelas onde é compilada alguma da informação existente referente a intervalos de referência para a concentração de vários elementos químicos em cabelo humano. Essa informação é relativa a valores reportados em várias publicações científicas e em relatórios disponíveis na *internet*, emitidos por laboratórios que comercializam serviços de quantificação de elementos químicos em cabelo.

Várias estratégias poderão ser adotadas pelos laboratórios para estabelecer os seus intervalos de referência para a concentração de elementos em cabelo. Algumas dessas estratégias são referidas em Druyan *et al.* (1998) e podem envolver a aplicação de normas internacionais, a adoção de intervalos de referência obtidos por outros laboratórios numa população semelhante à pretendida, ou a criação de intervalos de referência com base no histórico analítico de um laboratório individual. Não existe uma única forma de estabelecer intervalos de referência, mas a estratégia usada para cumprir esse objetivo deverá ser definida de forma crítica e devidamente justificada.

Os mecanismos de toxicidade de alguns metais estão associados a alterações metabólicas que envolvem a competição pelos sítios de ligação (por exemplo, grupos tiol) entre elementos tóxicos e metais essenciais (por exemplo, a substituição de Ca e Zn pelo

Pb). Assim, a contaminação do indivíduo com um determinado elemento pode levar à alteração da concentração de um outro elemento, como é exemplo o efeito antagonista verificado para o Zn e Cd. Para além disso, uma menor velocidade de crescimento do cabelo favorece uma maior acumulação de metais na fibra. Neste contexto, a razão entre a concentração de elementos poderá ser mais representativa, comparativamente às concentrações absolutas individuais, na definição de valores de referência para a concentração dos vários elementos químicos no cabelo (Chojnacka *et al.* 2012).

A pesquisa bibliográfica constatar que a técnica instrumental mais usada atualmente para a quantificação multielementar rotineira em cabelo é a técnica de ICP-MS. Isso pode ser explicado pelas vantagens dessa técnica analítica, discutidas de forma mais pormenorizada na próxima secção deste documento. Contudo, de acordo com Miekeley *et al.* (1998), a técnica analítica mais usada, pelo menos até 1995, pela maioria dos laboratórios clínicos para a quantificação multielementar em cabelo era a técnica de ICP-OES.

Miekeley *et al.* (1998) questionaram-se relativamente à validade dos intervalos de referência reportados nessa época por alguns laboratórios clínicos para a concentração de elementos em cabelo, indicando a sensibilidade insuficiente da técnica de ICP-OES como um dos motivos para as discrepâncias entre os intervalos indicados para alguns elementos. Para além disso, são ainda apontadas as más práticas em termos de controlo/garantia de qualidade como outro motivo para as diferenças verificadas. Nesse trabalho, os investigadores estabeleceram intervalos de referência para a concentração de vários elementos em cabelo, através da análise por ICP-MS de amostras recolhidas da zona occipital de 1091 adultos do Rio de Janeiro. Foram excluídas desse estudo amostras de cabelo pintado ou que contivessem concentrações excessivas de alguns elementos que pudessem provir de tratamentos capilares. O método analítico usado foi devidamente avaliado, para que existisse confiança nos resultados obtidos. Verificou-se que os intervalos de referência obtidos pelos investigadores nesse estudo não são significativamente diferentes dos reportados pelos laboratórios comerciais para a maioria dos elementos com concentrações superiores no cabelo (exemplos: P, Cu, Fe, e Zn). Para a quantificação desse tipo de elementos, ambas as técnicas de ICP (OES e MS) possuem sensibilidade adequada, o que explica as reduzidas diferenças. Contudo, maiores discrepâncias foram verificadas para elementos vestigiais, devido não só às limitações da técnica de ICP-OES em termos de limites de quantificação, mas também à deficiente correção de interferências. O caso mais

flagrante de ineficiência na correção de interferências foi verificado para o tório (Th), em que o limite superior do intervalo de referência reportado para esse elemento por um dos laboratórios é 850 vezes superior ao verificado usando a técnica de ICP-MS. A explicação apresentada para essa observação é a ocorrência de uma interferência em ICP-OES, que não terá sido eliminada. Um outro caso flagrante da pouca robustez dos intervalos de referência reportados pelos laboratórios comerciais considerados nesse trabalho é o arsénio (As). Foram indicados por alguns laboratórios como níveis normais de concentração de As em cabelo, valores inferiores a 7 e 10 µg/g, ainda que as concentrações desse elemento aceites como frequentes no cabelo sejam, de acordo com Miekeley *et al.* (1998), muito inferiores a esses valores, (<0,15 µg/g). Mesmo para o cálcio (Ca), um elemento não-vestigial, foram apresentadas anomalias entre os intervalos de concentração referidos pelos laboratórios e os obtidos no estudo realizado por Miekeley *et al.* (1998).

No trabalho de Miekeley *et al.* (1998) foram ainda enviadas réplicas de amostras, sujeitas previamente a lavagem, para vários laboratórios comerciais, de forma a avaliar a qualidade dos resultados produzidos. A comparação desses resultados resultou na verificação da ocorrência de diferenças relevantes. Por esse motivo, Miekeley *et al.* (1998) expressaram preocupação relativamente à validade dos intervalos de concentração de referência indicados por laboratórios comerciais, alertando para a necessidade de adotar práticas de controlo/garantia de qualidade eficientes na quantificação elementar em cabelos e de rever de forma crítica os intervalos de referência referidos na literatura.

Apesar dos problemas analíticos já referidos, várias organizações, em particular a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) (Jenkins 1979), a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) (Harkins *et al.* 2003) e a IAEA (Cortes Toro *et al.* 1993) atribuem potencial à análise de cabelo como uma ferramenta importante na avaliação da exposição a alguns elementos metálicos (Druyan *et al.* 1998). Contudo, é necessário desenvolver mais trabalho, nomeadamente na validação e normalização de métodos analíticos, para que esse tipo de análise possua uma base científica mais sólida.

## **2.2. Técnicas de análise com plasma acoplado indutivamente (ICP)**

Como visto na secção anterior, as técnicas de análise com plasma acoplado indutivamente (ICP), são muito usadas atualmente para a análise elementar de cabelo. Nesta secção, pretende-se apresentar uma visão geral desse tipo de técnicas analíticas, com especial destaque para a técnica de ICP-MS, a técnica em que se centrou este trabalho.

### **2.2.1. Plasma – características gerais e sua aplicação à química**

Ao aumento de energia das partículas contidas num determinado sistema corresponde a seguinte transformação sequencial da matéria: sólido, líquido, gás e plasma, o que justifica o uso frequente do termo “quarto estado da matéria” para designar o plasma (Fridman 2008).

Resumidamente, um plasma consiste num gás ionizado macroscopicamente neutro, em que coexistem, num espaço confinado, iões e eletrões livres (Mermet 2007). Pode ser gerado de forma natural (exemplos: relâmpagos, auroras boreais e estrelas) ou artificial, sendo usado atualmente em aplicações científicas e industriais (Fridman 2008).

As vantagens da utilização do plasma na área da química analítica estão relacionadas com os valores superiores de temperaturas e densidades de energia atingidos, comparativamente ao que se verifica com a aplicação de tecnologia mais convencional (chama). Para além disso, é possível manter um sistema de plasma em condições de não-equilíbrio termodinâmico, o que permite obter zonas do plasma com altas temperaturas, mantendo a temperatura global do sistema relativamente baixa. Essas características do plasma permitem a produção, em grande quantidade, de espécies/estados muito energéticas(os) e altamente reativas(os) (eletrões, iões, átomos, radicais, estados excitados e fotões), o que confere a estes tipo de técnica um grande potencial analítico (Fridman 2008).

### **2.2.2. Formação de plasma**

Existem várias formas de criar um plasma artificialmente, que correspondem a diferentes designações do plasma: de corrente direta (DCP), acoplado indutivamente (ICP), induzido por micro-ondas (MIP) e induzido por laser (LIBS). Os instrumentos de DCP foram os primeiros a ser comercializados. Contudo, o ICP é a forma de geração de plasma mais usada atualmente, devido a algumas especificidades que a tornam a mais interessante para as aplicações mais comuns (Mermet 2007).

A formação artificial de plasma implica o fornecimento de energia na forma de um campo eletromagnético externo, para ionizar o gás e sustentar o plasma formado nesse processo que, por sua vez, poderá transmitir parte da sua energia na atomização, ionização e excitação de outras partículas nesse meio. O argon (Ar) é o gás mais usado na formação artificial de plasma aplicada à química, pois é o gás nobre mais barato, possui uma alta energia de ionização (15,76 eV), minimiza a formação de compostos com o analito, é capaz de ionizar e excitar a maioria dos elementos e o seu espectro de emissão é simples. O único inconveniente é a sua baixa condutividade térmica (Mermet 2007).

A formação de plasmas em ICP ocorre numa peça designada por tocha, que consiste normalmente em três tubos de quartzo concêntricos. O gás (Ar) que passa entre os tubos externo e intermédio é chamado de gás de suporte ao plasma e a sua principal função é alimentar o plasma, mantendo-o estável. Tipicamente, os aparelhos de ICP usam um caudal de gás de suporte entre 12 e 17 L/min. Uma segunda corrente de gás passa entre o tubo intermédio e o tubo interno (gás auxiliar), geralmente com um caudal de aproximadamente 1 L/min, e a sua função é alterar a posição da base da “língua” de plasma relativamente à extremidade da tocha. O tubo mais interno transporta a amostra, na forma de um aerossol, que é arrastado por um caudal de gás de aproximadamente 1 L/min. (Thomas 2001a)

Como a tocha constitui uma das partes principais dos equipamentos de ICP, é importante entender a forma como o plasma é gerado nessa zona do instrumento (**Figura 10**), pois a capacidade analítica depende bastante do funcionamento desse componente. Primeiramente, um fluxo tangencial (em espiral) de Ar é aplicado entre os tubos externo e intermédio da tocha. A bobina de indução, que é geralmente de cobre, é arrefecida com um caudal de água atravessando o seu interior. Essa bobina é disposta em torno da extremidade aberta da tocha, onde é gerado o plasma, e está conectada a um gerador de radiofrequências. Aplicando potência de radiofrequência (700-1500 W), forma-se uma corrente alternada no interior da bobina. Geralmente, o gerador de radiofrequências é ajustado para uma frequência entre 27 e 40 MHz. A passagem de corrente elétrica alternada pela bobina gera um campo eletromagnético intenso na extremidade da tocha e com caudal de Ar a passar no interior da tocha é gerada uma faísca que provoca a separação de alguns eletrões dos respetivos átomos de árgon. Esses eletrões são acelerados no interior do campo eletromagnético gerado, colidindo com os átomos de Ar, o que origina a libertação de ainda mais eletrões. Desta forma, ocorre uma reação em cadeia que provoca a quebra de mais átomos em iões e eletrões livres, originando a descarga de ICP (Thomas 2001a).



Figura 10 – Representação da sequência de geração de plasma numa tocha de ICP (Thomas 2001a)

Vários mecanismos de excitação/ionização na fonte de plasma têm vindo a ser propostos (Mermet 2007). Esses mecanismos envolvem os vários componentes da mistura

de espécies químicas que constitui o plasma. No caso dos plasmas de Ar, as espécies principais são os iões  $\text{Ar}^+$  e os elétrons livres, mas existem também átomos de argon em estados excitados, alguns em estados metaestáveis, e ainda espécies moleculares (exemplos:  $\text{Ar}_2^+$ ,  $\text{ArO}^+$  e  $\text{ArOH}^+$ ) (Taylor 2001, Mermet 2007). Estas espécies iónicas constituem o ruído de fundo associado aos equipamentos de ICP-MS (Skoog *et al.* 2013)

### 2.2.3. ICP-MS

Em ICP-MS o sinal analítico medido é o número de contagens de iões com uma determinada razão massa-carga ( $m/z$ ). A técnica de ICP-MS requer mais energia do que a utilizada para a atomização, uma vez que também é necessário a ionização dos vários elementos que se pretendem quantificar (Thomas 2001a). O mecanismo de formação de iões para a análise por ICP-MS é apresentado na **Figura 11**.

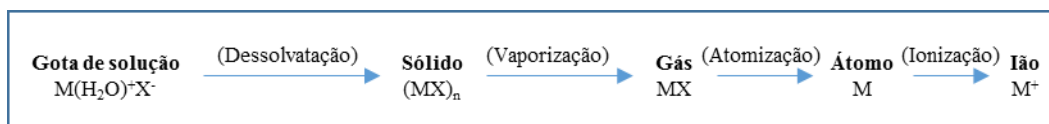


Figura 11 – Mecanismo de conversão do analito dissolvido numa gota de solução no respetivo ião (Thomas 2001a)

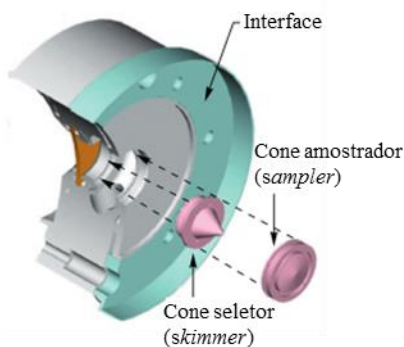
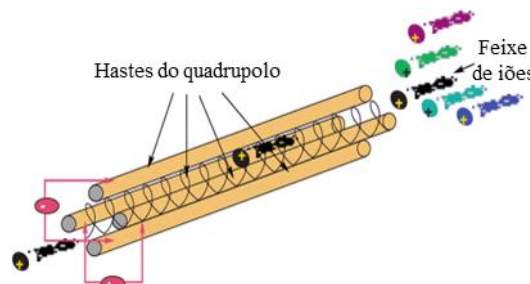


Figura 12 – Detalhe dos cones na interface entre a fonte de plasma e o espectrómetro de massa (Thomas 2001b)

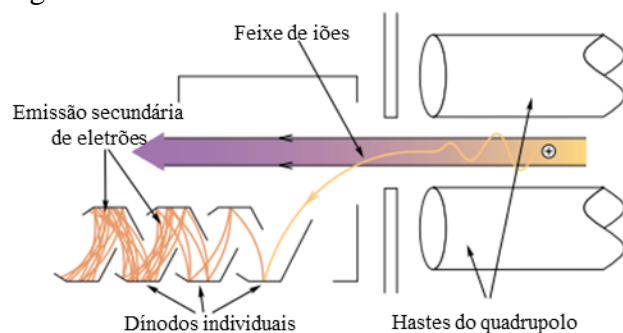
Em ICP-MS, os iões formados são extraídos do plasma para o interior do espectrómetro de massa, atravessando um analisador que faz a separação destes, de acordo com as respetivas razões  $m/z$ . A zona entre o plasma e o analisador é designada por interface e tem como principal função de assegurar que uma fração substancial dos iões produzidos no plasma seja transportada para o analisador de massas. A interface (**Figura 12**) consiste em dois cones metálicos, denominados de *sampler* (amostrador) e *skimmer* (seletor) (Skoog *et al.* 2013). Esses cones são refrigerados e são normalmente de níquel, como se verifica no equipamento de ICP-MS do LCA, ou de platina, a qual possui uma maior resistência à corrosão (Thomas 2001b). O plasma é orientado na direção do *sampler*, que possui um orifício com um diâmetro de  $\approx 1$  mm, por onde uma fração do plasma pode passar. O *skimmer* está localizado posteriormente ao *sampler* e possui um orifício de  $\approx 0,3$  mm. Uma lente extratora, posterior ao *skimmer*, possui um potencial elétrico negativo elevado, que atrai os catiões em direção ao analisador de iões. A pressão é sucessivamente reduzida ao longo da interface, atingindo praticamente o vácuo à entrada do analisador de iões (Harris 2010).

Um quadrupolo (**Figura 13**), que é o tipo de analisador de íons do equipamento de ICP-MS do LCA, consiste em quatro hastes cilíndricas metálicas, orientadas na forma de um losango. As hastes dos quadrupolos usados em ICP-MS têm tipicamente uma extensão entre 15 e 20 cm e um diâmetro de 1 cm (Thomas 2002a). Um quadrupolo é classificado como um filtro de massas, permitindo apenas a passagem, num dado instante de tempo, de íons com uma determinada razão  $m/z$ . O funcionamento deste tipo de analisadores baseia-se na aplicação de uma diferença de potencial de corrente contínua num dos pares de hastes opostas entre si, enquanto o outro par é sujeito à aplicação de uma diferença de potencial de corrente alternada de radiofrequências (2-3 MHz). Dependendo das voltagens aplicadas ao quadrupolo, apenas íons com um determinado valor de  $m/z$  possuem uma trajetória estável na sua passagem ao longo do quadrupolo, sendo por isso transmitidos. Todos os restantes íons são ejetados através dos espaços existentes entre as hastes do quadrupolo. Ao variar as voltagens aplicadas, é possível fazer um varrimento dos valores de  $m/z$  dos íons transmitidos. O principal inconveniente associado a este tipo de analisador de íons é a sua baixa resolução, que corresponde a 1 unidade de massa atômica (1 amu) (Thomas 2002a, Skoog *et al.* 2013).



**Figura 13** – Esquema representativo do princípio de funcionamento de um analisador de íons quadrupolar. (Thomas 2001c).

Os íons que conseguem atravessar o quadrupolo (i.e. que são transmitidos) atingem o detetor, que, ao ser incidido pelo feixe de íons, gera um sinal elétrico mensurável. O detetor do equipamento de ICP-MS do LCA é um multiplicador de elétrons com dínodos discretos. O funcionamento deste tipo de detetor baseia-se na colisão de íons com um dínodo que gera a emissão da “cascata” de elétrons. Geralmente, este detetor é colocado numa posição ligeiramente desalinhada relativamente à saída do quadrupolo, pois isso permite reduzir o



**Figura 14** – Representação de um multiplicador de elétrons de dínodos discretos (Thomas 2002a)

ruído de fundo, o que obriga os íons transmitidos a seguir uma trajetória curvilínea até atingirem o primeiro dínodo e originarem a emissão secundária de elétrons, tal como é representado na **Figura 14** (Thomas 2002a).



Os primeiros equipamentos de ICP-MS comercializados forneciam uma gama linear de resposta que abrangia cerca de cinco ordens de grandeza. O alargamento dessa gama linear de resposta foi, durante alguns anos, um problema difícil de resolver. Apesar disso, foram entretanto encontradas estratégias que permitem resolver esse problema, sendo que os equipamentos de ICP-MS comercializados atualmente possuem uma gama linear de resposta consideravelmente maior (Thomas 2002a).

De entre as estratégias encontradas para obter uma gama linear de resposta mais ampla, a mais vantajosa em termos de custos e tempo de análise é a utilização de um único detetor com dois modos de operação (analógico e digital), aplicados alternadamente em função da concentração da espécie química de interesse. O modo digital possibilita uma maior sensibilidade, enquanto a operação no modo analógico é usada para reduzir a sensibilidade, permitindo estender a gama de resposta do detetor a valores mais altos de contagem. A alternância entre os dois modos de operação pode ser feita por intermédio da realização de dois varrimentos de massa para cada amostra ou de um único varrimento (Thomas 2002a).

A realização de dois varrimentos por amostra envolve duas abordagens possíveis: (1) realização de um primeiro varrimento completo em modo analógico, seguido de um segundo varrimento completo em modo digital ou (2) realização de um primeiro varrimento exploratório, para determinar qual o modo de detecção mais adequado para cada valor de massa, seguido de um segundo varrimento onde cada massa é lida no modo mais indicado de acordo com o varrimento preliminar. Os equipamentos executam automaticamente a mudança do modo de detecção. No caso do equipamento de ICP-MS do LCA, e em muitos equipamentos atuais, é feito um único varrimento completo, durante o qual ambos os modos de detecção são usados. Isso é conseguido, com o multiplicador de elétrons de díodos discretos, através da medição do sinal analógico no dínodo intermédio do detetor (**Figura 15**). Quando um determinado patamar de número de iões detetados é ultrapassado, a formação das “cascata” de elétrons é interrompida e o sinal é processado através do circuito analógico. Se o número de iões detetados estiver abaixo do patamar definido, a “cascata” de elétrons é amplificada nos restantes díodos e o sinal é medido na forma de pulsos (modo digital) (Thomas 2002a).

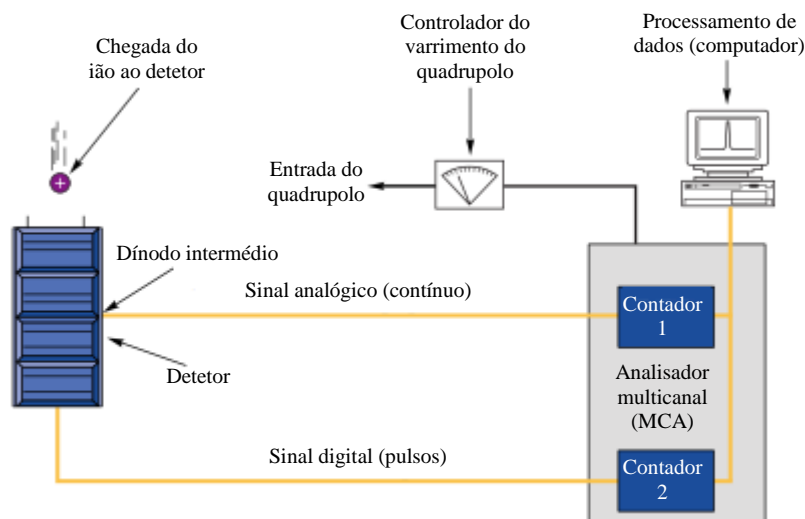


Figura 15 – Circuito para a operação simultânea do detector de díodos discretos nos modos analógico e digital (Thomas 2002a).

O modo de detecção digital é linear numa gama de valores de taxa de contagem até cerca de  $10^6$  contagens por segundo (cps), enquanto o modo de detecção analógico apresenta comportamento linear para valores de taxa de contagem entre  $10^4$  e  $10^9$  cps. Para conseguir incluir ambas as gamas numa única função de resposta do detector, é realizada uma “calibração cruzada” (*cross calibration*). Essa calibração resulta na normalização das duas retas que representam a resposta instrumental em cada gama de concentrações, obtendo-se uma única função de resposta, como é representado na **Figura 16**. Essa normalização é possível conhecendo a voltagem aplicada no modo analógico inicial, a corrente de saída e um fator de conversão definido pelos circuitos elétricos de detecção (Thomas 2002a).

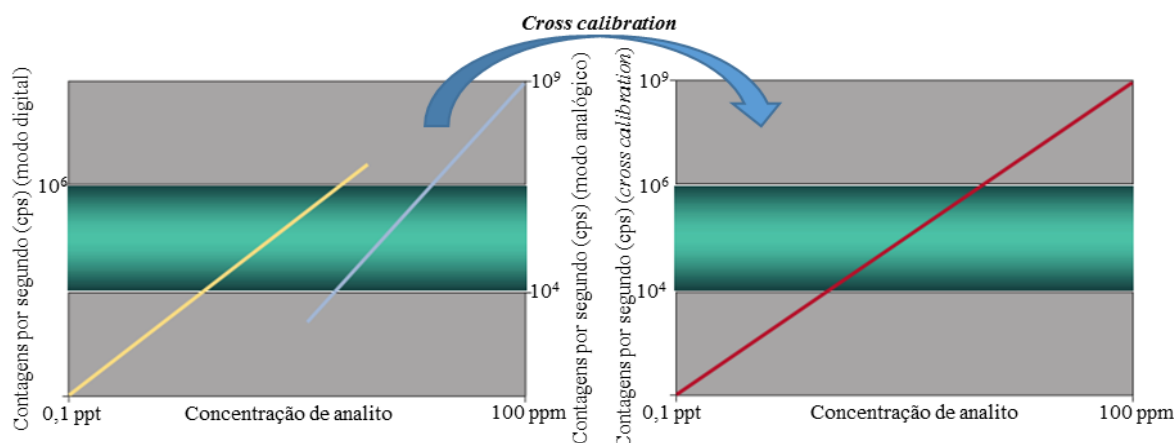


Figura 16 – Ajuste da gama linear de resposta do detector através da calibração cruzada. As linhas a amarelo e azul correspondem, respetivamente, às gamas de resposta linear para os modos digital e analógico de funcionamento do detector. A linha a vermelho representa a gama de resposta linear obtida após a calibração cruzada. A banda a verde delimita as taxas de contagem (cps) incluídas na gama linear de resposta do detector de ambos os modos de detecção (Thomas 2002a).

As condições e variáveis da aquisição do sinal analítico em ICP-MS têm um impacto direto na qualidade dos resultados obtidos. Assim, para interpretar de forma mais adequada

os resultados é importante entender como ocorre essa aquisição de sinal. Algumas das variáveis envolvidas na aquisição do sinal em ICP-MS são (Thomas 2002b, Coimbra 2007):

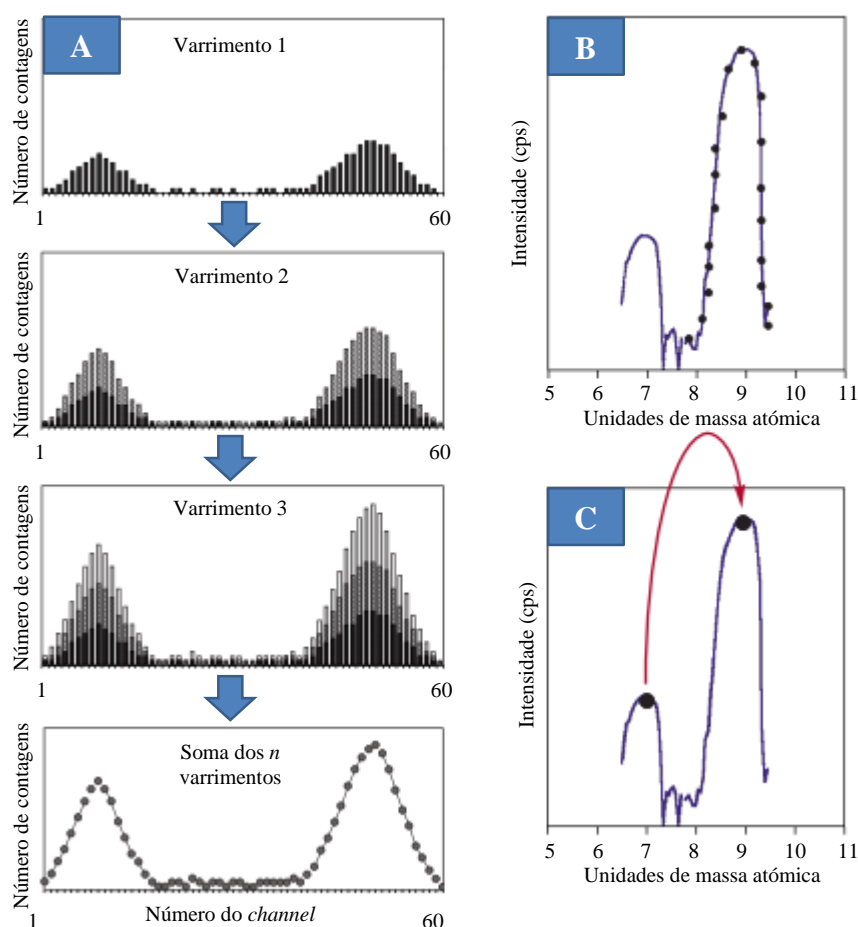
- Canais (*Channels*) – Número de valores de razão  $m/z$  usados na aquisição do sinal correspondente a um determinado isótopo, ou seja, número de pontos usados para definir o perfil do pico correspondente a um determinado isótopo.
- Varrimentos (*Sweeps*) – Número de varrimentos (*scans*) realizados nos intervalos de massa correspondentes aos isótopos a quantificar;
- Tempo de aquisição do sinal (*Dwell time*) – Tempo, em milissegundos (ms), de leitura em cada canal durante um varrimento, ou seja, tempo durante o qual todas as condições do equipamento são mantidas para permitir a transmissão ao longo do quadrupolo e a detecção de iões com um valor de  $m/z$  específico.

A aquisição do sinal de um isótopo com determinado valor de  $m/z$  em ICP-MS pode ser realizada de duas formas (Thomas 2002b):

- (1) Varrimento multicanal (semicontínuo), em que cada unidade de massa é dividida em  $n$  pontos de razões  $m/z$  (canais) onde são realizadas leituras do sinal analítico. Um maior número de canais implica uma melhor definição do pico correspondente;
- (2) Varrimento discreto, em que as condições do equipamento são variadas para que o quadrupolo deixe passar sucessivamente iões que correspondam a picos independentes. A medição do sinal analítico é feita apenas num dos pontos do pico, geralmente no ponto onde se obtém o máximo de intensidade do sinal, i.e. o maior número de contagens de iões com um determinado valor de  $m/z$  e num determinado instante de tempo.

As duas formas de aquisição do sinal referidas são representadas na **Figura 17**. Os gráficos A e B representam o modo multicanal de aquisição do sinal analítico, enquanto o gráfico C representa o modo discreto. No gráfico A é também possível visualizar o efeito cumulativo de amplificação do sinal analítico associada à realização de vários varrimentos ao longo de vários canais, que resulta, neste caso, numa maior definição de dois picos.

O equipamento de ICP-MS existente no LCA permite a utilização dos dois modos de aquisição do sinal analítico referidos, pois cada um desses modos possui vantagens específicas que acabam por se complementar.



**Figura 17 – Obtenção dos picos analíticos num equipamento de ICP-MS** (Thomas 2002b). **A:** Formação do perfil de dois picos através da acumulação de pulsos em vários canais ao longo de *sweeps* sucessivos; **B:** Obtenção de um pico por varrimento multicanal (20 *channels* por unidade de massa); **C:** Aquisição do sinal analítico em modo discreto.

Quando se pretende realizar análise quantitativas e obter o máximo de sensibilidade do equipamento, o método de aquisição discreta do sinal permite obter melhores resultados, pois praticamente todo o tempo de análise ( *dwell time*) é empregue na aquisição do sinal no valor de  $m/z$  correspondente ao máximo desse sinal (topo do pico), em vez de ser distribuído na aquisição do sinal em vários pontos, nomeadamente nas “caudas” e nos “vales” dos picos, que são zonas do espectro de massa que têm uma menor contribuição para o sinal analítico e uma maior contribuição para o ruído instrumental, o que implica consequências negativas na precisão das medições do sinal nessas zonas, tal como indicado na **Figura 18**, devido à menor razão sinal-ruído. Para obter o máximo benefício deste modo de aquisição do sinal, é essencial que a medição do sinal seja feita no máximo do pico correspondente. Assim, é importante que o equipamento possua uma estabilidade que permita que as medições sucessivas ao longo dos vários varrimentos sejam realizadas no mesmo ponto (no máximo de sensibilidade). A variação referente ao ponto do pico do espectro de massa onde é medido

o sinal analítico pode ser minimizada através do controlo de temperatura da fonte de alimentação do quadrupolo e da sala onde se encontra o equipamento de ICP-MS (Thomas 2013).

O modo de aquisição do sinal com leitura em vários pontos (multicanal) tem a vantagem de permitir a obtenção de informação da forma e resolução dos picos. Para além disso, este modo permite ainda verificar a calibração de massa, i.e. verificar se os picos obtidos se encontram

centrados num valor de  $m/z$  (experimental) próximo do valor de  $m/z$  teórico (Thomas 2002b).

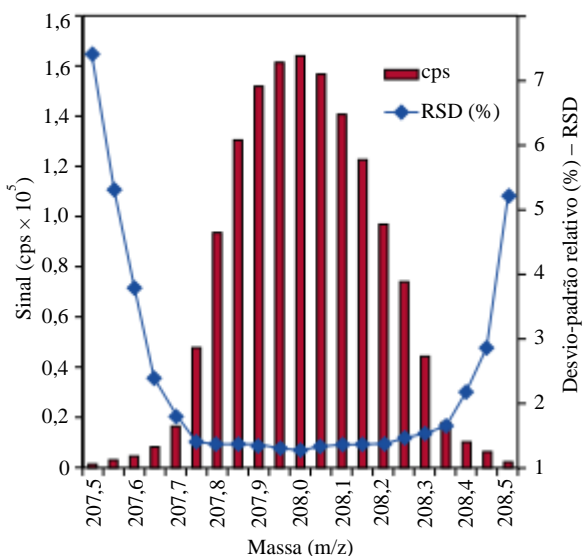


Figura 18 – Efeito na precisão de medidas sucessivas do sinal analítico em diferentes zonas do pico do isótopo  $^{208}\text{Pb}$  (Thomas 2002b)

#### 2.2.4. Elementos quantificáveis com técnicas de ICP

Na **Figura 19** é possível verificar a grande versatilidade das técnicas de ICP para a análise elementar, comparativamente às técnicas comuns de absorção atômica (AA). No *website* indicado na referência [10] é apresentada uma tabela periódica interativa, que permite avaliar, para cada elemento, o tipo de técnica de ICP que pode ser usada na sua quantificação, os limites de deteção típicos e as interferências conhecidas.

1 H 1.008																	2 He 4.003				
3 Li 6.941	4 Be 9.009															5 B 10.81	6 C 12.01	7 N 14.01	8 O 16.00	9 F 18.99	10 Ne 20.18
11 Na 22.99	12 Mg 24.31															13 Al 26.98	14 Si 28.09	15 P 30.97	16 S 32.07	17 Cl 35.45	18 Ar 39.95
19 K 39.10	20 Ca 40.08	21 Sc 44.96	22 Ti 47.88	23 V 50.94	24 Cr 52.00	25 Mn 54.94	26 Fe 55.85	27 Co 58.93	28 Ni 58.69	29 Cu 63.55	30 Zn 65.38	31 Ga 69.72	32 Ge 72.64	33 As 74.92	34 Se 78.96	35 Br 79.90	36 Kr 83.80				
37 Rb 85.47	38 Sr 87.62	39 Y 88.91	40 Zr 91.22	41 Nb 92.91	42 Mo 95.94	43 Tc (98)	44 Ru 101.1	45 Rh 102.9	46 Pd 106.4	47 Ag 107.9	48 Cd 112.4	49 In 114.8	50 Sn 118.7	51 Sb 121.8	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3				
55 Cs 132.9	56 Ba 137.3	57 La 138.9	72 Hf 178.5	73 Ta 180.9	74 W 183.8	75 Re 186.2	76 Os 190.2	77 Ir 192.2	78 Pt 195.1	79 Au 197.0	80 Hg 200.6	81 Tl 204.4	82 Pb 207.2	83 Bi 208.9	84 Po (210)	85 At (210)	86 Rn (222)				
87 Fr (223)	88 Ra (226)	89 Ac (227)																			
			58 Ce 140.1	59 Pr 140.9	60 Nd 144.2	61 Pm (147)	62 Sm 150.4	63 Eu 151.9	64 Gd 157.3	65 Tb 158.9	66 Dy 162.5	67 Ho 164.9	68 Er 167.3	69 Tm 168.9	70 Yb 173.0	71 Lu 175.0					
			90 Th 232.0	91 Pa (231)	92 U (238)	93 Np (237)	94 Pu (242)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (251)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (262)					

Figura 19 – Tabela periódica com indicação das técnicas espectroscópicas mais adequadas para a quantificação de cada elemento (ThermoElemental 2001)

### 2.2.5. Interferências em ICP-MS

As interferências que podem ocorrer em ICP-MS dividem-se em dois tipos principais: espectrais e de matriz. As interferências espectrais estão associadas à obtenção de um sinal analítico em que a sua intensidade é afetada não só pelo analito, mas também por outras espécies químicas interferentes ou por ruído instrumental. As interferências de matriz estão associadas às características da matriz da amostra que possam comprometer a quantificação adequada de analito.

Na técnica de ICP-MS, as interferências espectrais ocorrem quando espécies químicas iônicas (moleculares ou atômicas) possuem valores de razão  $m/z$  muito próximos do analito, e o analisador de iões não possui resolução suficiente para conseguir distinguir as diferentes espécies iônicas. A esse tipo de interferências dá-se o nome de isobáricas. Para minimizar o efeito desse tipo de interferências, são usadas correções matemáticas inter-elementares. Pode ainda usar-se um outro isótopo menos abundante do analito, mas que não esteja tão sujeito a interferências, o que acarreta, porém, consequências negativas em termos de sensibilidade. Outras alternativas para minimizar o efeito deste tipo de interferências incluem o uso de um analisador com maior resolução (setor magnético), a aplicação de uma célula de colisões para quebrar iões moleculares, e/ou o aumento da temperatura da fonte de plasma. Contaminações no branco e efeitos de memória podem originar algum ruído instrumental, o que poderá acarretar consequências negativas em termos de sensibilidade, especialmente significativas quando se pretende quantificar elementos com concentração na ordem de ng/L. A técnica de ICP-MS é sensível a interferências de matriz, principalmente quando a matriz é complexa. Isso deve-se ao elevado número de espécies químicas que podem ocorrer no plasma. Por esse motivo, é necessário um especial cuidado nos métodos de preparação de amostras, nomeadamente na escolha dos ácidos a usar na conversão de matrizes sólidas em matrizes líquidas. No caso de matrizes orgânicas, nomeadamente o cabelo, deverão ser usados métodos de tratamento da amostra que permitam a eliminação de carbono, pois a combinação do carbono com outros elementos pode conduzir a interferências significativas na quantificação de determinados analitos (exemplo: interferência de  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$  na quantificação de  $^{52}\text{Cr}^+$ ). Podem ainda ocorrer interferências associadas às propriedades físicas da amostra (viscosidade e tensão superficial) e poderá ser necessário usar padrões que tenham sido preparados no mesmo tipo de matriz existente nas amostras a analisar, um padrão interno, ou realizar a calibração recorrendo ao método da adição de padrão

(ThermoElemental 2001). No contexto deste trabalho, a correção deste tipo de interferências foi realizada recorrendo à utilização de um conjunto de isótopos como padrões internos.

A tabela periódica interativa do *website* indicado na referência [10] permite identificar as interferências típicas de cada uma das técnicas de ICP referidas na quantificação de cada elemento.

### **2.3. Validação de métodos (sistemas) analíticos**

Em todos os laboratórios, independentemente do seu carácter comercial ou de investigação, os resultados da execução de um determinado procedimento analítico deverão satisfazer a finalidade definida. Se os resultados não satisfizerem essa finalidade, então a execução desse procedimento será uma perda de recursos, a não ser que seja possível reajustar os objetivos em função dos resultados verificados. Se um laboratório comercial suspeitar que os resultados obtidos não são confiáveis, ou se verificar que estes não satisfazem as exigências do cliente, terá de suportar os custos associados à repetição das análises requisitadas. Portanto, os laboratórios deverão garantir a validade dos resultados que produzem, para manter a confiança do cliente e evitar prejuízos comerciais [11].

É possível obter resultados válidos se forem implementados um conjunto de princípios básicos na realização dos métodos analíticos. Esses princípios estão bem representados numa lista elaborada no final da década de 1980, no Reino Unido, no âmbito de um programa governamental com a designação “*Valid Analytical Measurement programme*”, que visava a redução dos prejuízos associados a más práticas laboratoriais. As afirmações elaboradas no contexto desse programa são chamadas de princípios VAM (*Valid Analytical Measurement*) e estabelecem um conjunto de regras que promovam elevados índices de qualidade laboratorial e conduzam à obtenção de resultados analíticos válidos (Gillespie *et al.* 1999, Sargent 2003) [11].

Os princípios VAM são os seguintes (Eurachem 2014) [11]:

- (1) As medições analíticas deverão ser realizadas com vista a satisfazer um requisito (objetivo) previamente estabelecido;
- (2) As medições analíticas deverão ser realizadas usando métodos e equipamentos que tenham sido verificados, de forma a assegurar que estes estão ajustados ao propósito a que se destinam (i.e. cumprem os requisitos estabelecidos para um determinado procedimento);
- (3) O pessoal responsável pela realização de medições analíticas deverá ser competente e qualificado para a devida execução desse tipo de tarefa;

- (4) Deverá existir uma avaliação regular e independente do desempenho do laboratório;
- (5) Os resultados de medição obtidos num determinado local, usando um determinado procedimento, deverão ser consistentes com os resultados obtidos, aplicando o mesmo procedimento, num outro qualquer local;
- (6) Devem ser adotados procedimentos bem definidos de controlo e garantia da qualidade.

O trabalho apresentado neste documento enquadra-se essencialmente no princípio 2, pois o seu objetivo é verificar um método (de análise de cabelo por ICP-MS), para garantir que este é adequado para a finalidade pretendida, ou seja, proceder à validação do método.

Consultando a literatura relacionada com a metrologia química, verifica-se que este termo (“validação do método”) é o mais usado quando o tema da validação é referido. Apesar disso, no contexto da química analítica, poderá ser mais rigoroso empregar-se o termo “validação do sistema analítico”, em que o sistema analítico corresponde ao próprio método analítico (incluindo, quando for o caso, as etapas de amostragem), à matriz à qual o método será aplicado e à gama de concentrações considerada (Miller *et al.* 2010).

### **2.3.1. Definição de validação de um sistema analítico e de termos associados**

A metrologia é uma área onde existe ainda algum desacordo quanto à terminologia usada, verificando-se frequentemente o uso de diferentes designações para o mesmo conceito e da mesma designação para diferentes conceitos. Todavia, nos últimos anos, tem sido feito um esforço significativo para uniformizar a nomenclatura metrológica, de forma a reduzir as incertezas e os erros de interpretação. Neste contexto de procura da harmonização desta nomenclatura, foi criado, em 1984, o “*International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology*” (“VIM”, do francês “*Vocabulaire International de Métrologie*”), um documento elaborado por várias organizações internacionais, que compila praticamente todos os termos usados em metrologia, definindo claramente o seu significado e indicando as relações existentes entre eles (De Bièvre 2012, Rabinovich 2013). Assim, procurou-se que todo o vocabulário usado neste trabalho esteja de acordo com o que é apresentado na 1ª edição luso-brasileira do VIM (Cruz *et al.* 2012), a versão oficial de Língua Portuguesa da mais recente edição internacional (3ª edição) do VIM (BIPM *et al.* 2008b).

Não existe ainda consenso relativamente à definição de validação e de alguns dos termos relacionados (Eurachem 2014). As confusões associadas à validação advêm principalmente do facto de organizações de diferentes países, e em diferentes períodos de



tempo, criarem guias que não estão em total acordo quanto às definições apresentadas e ao número de parâmetros de desempenho a incluir no procedimento de validação (Miller *et al.* 2010). No contexto específico da química analítica, a Eurachem e a IUPAC têm procurado definir claramente a validação de métodos analíticos e os termos relacionados, publicando documentos que visam clarificar esse vocabulário, como são exemplo um conjunto de relatórios técnicos da IUPAC e um guia da Eurachem publicado em 2008 (“*Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3*”).

No mais recente guia da Eurachem referente à validação de sistemas analíticos (“*The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*”) (Eurachem 2014) são referidas três definições de validação, apresentadas em três documentos normativos internacionais: ISO 9000:2005, ISO/IEC 17025:2005 e VIM (3ª edição). Embora essas definições sejam ligeiramente diferentes, a ideia associada a todas elas é a mesma: comprovar, através de evidência objetiva, que um determinado procedimento é adequado para o uso pretendido.

As definições do VIM referentes à validação que foram consideradas neste trabalho são (Cruz *et al.* 2012):

- Verificação – Fornecimento de evidência objetiva de que um dado *item* satisfaz requisitos especificados;
- Validação – Verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido.

São apresentadas duas definições porque a validação é um caso específico de uma verificação. Confusões no uso destes dois conceitos (verificação e validação) são bastante frequentes. Um laboratório pode adotar um método normalizado e/ou adquirir um equipamento para usar nas suas instalações. Em ambos os casos, a validação foi já realizada pela entidade que desenvolveu/normalizou o método ou pelo fabricante do equipamento. Contudo, o laboratório terá de confirmar que consegue aplicar adequadamente o método adotado ou operar o equipamento adquirido, ou seja, terá de proceder a uma verificação. O trabalho inerente a essa verificação é, contudo, menor que o necessário para validar o procedimento adotado e o funcionamento do equipamento adquirido (Eurachem 2014).

### **2.3.2. Importância da validação de sistemas analíticos**

Milhares de ensaios são realizados diariamente em laboratórios de todo o mundo e praticamente todos os setores da sociedade estão dependentes dos resultados obtidos nesses

ensaios. Várias decisões de grande responsabilidade dependem do desempenho analítico desses laboratórios, como, por exemplo o diagnóstico de uma patologia, a aplicação de um castigo a um desportista pela deteção do uso de substâncias dopantes, condenações a penas de prisão (inclusive execução, em alguns países), proibição da comercialização de um produto, entre outras (Miller *et al.* 2010, Eurachem 2014). Assim, é inegável a grande importância de serem gerados resultados analíticos válidos, para que seja possível ter confiança nas decisões tomadas, com base nesses resultados. Para além da sua importância em termos da qualidade dos resultados gerados, a validação de um sistema analítico permite também obter conhecimento e experiência dos aspetos práticos do sistema analítico avaliado, permitindo identificar etapas críticas do método analítico executado (Eurachem 2014).

### **2.3.3. Processo de validação de um sistema analítico**

De acordo com a NP ISO/IEC 17025:2005, um sistema analítico deve ser validado sempre que o método usado seja: não-normalizado; tenha sido desenvolvido pelo laboratório (*in house*); ou é normalizado, mas vai ser aplicado para uma finalidade que está fora do que foi definido no âmbito do processo de normalização. No caso de métodos normalizados, como já foi referido, o laboratório terá de verificar que é capaz de executar devidamente o método adotado. Sempre que um sistema analítico já validado seja alterado de forma significativa (exemplos: uso de diferentes instrumentos, matrizes, gamas de concentração, etc.) terá de ser revalidado (Miller *et al.* 2010).

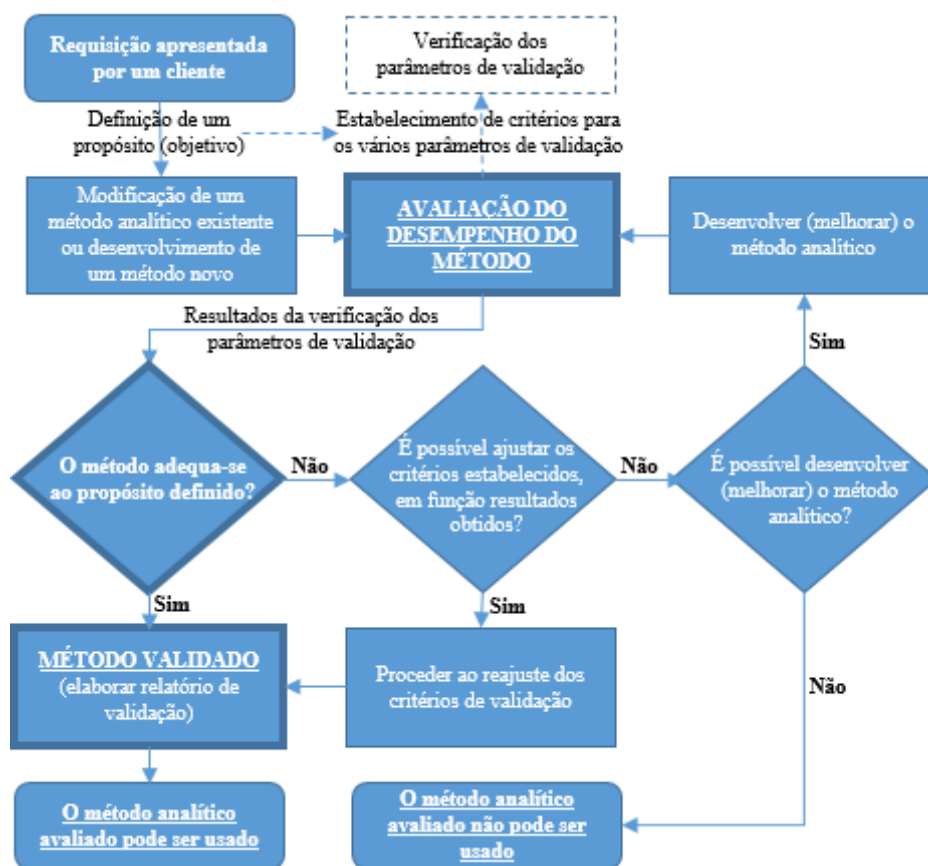
Existem duas formas principais de abordar o processo de validação de um sistema analítico: abordagem interlaboratorial (vários laboratórios) e abordagem intralaboratorial (um único laboratório) (Eurachem 2014).

A abordagem interlaboratorial envolve estudos de comparação entre vários laboratórios que geram resultados usando o sistema analítico que se pretende validar. Esta estratégia de validação é preferível quando o sistema analítico possui uma ampla aplicação, podendo vir a tornar-se um procedimento normalizado. Um sistema analítico que é validado dessa forma demonstra ser robusto. Esta estratégia de validação é frequentemente adotada pelos organismos de normalização (Eurachem 2014).

Frequentemente, os laboratórios verificam que necessitam de um determinado tipo de procedimento de análise para o qual não existe ainda nenhuma norma. Nesse caso, o laboratório terá de desenvolver um procedimento analítico, com base no objetivo que pretende atingir e nos recursos de que dispõe. Neste contexto, o laboratório poderá não aderir

a exercícios de comparação interlaboratorial (ECI) para validar o procedimento analítico desenvolvido, por uma questão estratégica (minimização da custos). Para este tipo de situações, uma validação realizada internamente (intralaboratorial) poderá ser a estratégia mais adequada (Thompson *et al.* 2002, Eurachem 2014). Contudo, em Portugal, tendo em conta o procedimento do IPAC para acreditação de laboratórios (DRC 005) [7], essa opção impede uma eventual acreditação. De notar ainda que um laboratório participante num ECI tem normalmente salvaguardada a proteção da sua identidade.

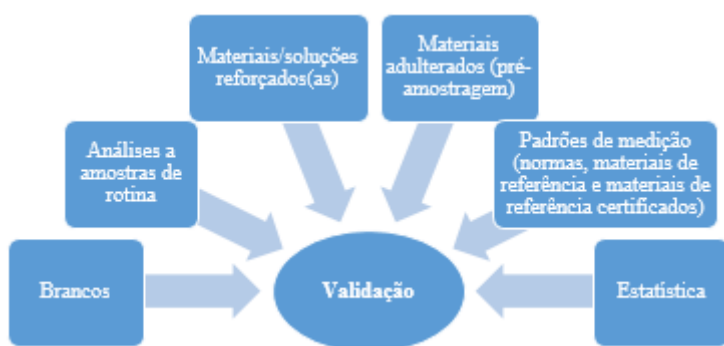
A validação envolve a definição de um objetivo para a análise e de um conjunto de parâmetros de desempenho que deverão ser avaliados. O fluxograma da **Figura 20** representa o processo global de validação de um sistema analítico. O fluxograma apresentado inicia-se com a requisição de um cliente como “força motriz” iniciadora do processo de validação. Contudo, um laboratório poderá proceder a essa validação por iniciativa própria, no contexto, por exemplo, de um trabalho de investigação.



**Figura 20 – Fluxograma representativo do procedimento genérico para a validação de um sistema analítico.** A requisição de um cliente poderá originar a decisão do laboratório em adotar um determinado método analítico. A validação consiste, de forma simplificada, em verificar que o método escolhido permite dar resposta à requisição apresentada. A adequabilidade do método para o propósito definido é verificada pelo desempenho do método, comparando-o com critérios estabelecidos, realizado por um técnico designado com os equipamentos/materiais disponíveis no laboratório (Eurachem 2014).

- **Ferramentas de validação**

Para poder avaliar os vários parâmetros de validação necessários ao cumprimento do objetivo definido, existem várias ferramentas. Seguidamente neste documento, ao referir cada um dos parâmetros de validação típicos, será feita uma descrição de como esses parâmetros podem ser avaliados. No entanto, para que a informação seja mais clara, é relevante referir as ferramentas de validação existentes, pois verifica-se que existem ainda algumas confusões quanto ao significado e à utilidade de algumas dessas ferramentas. Na **Figura 21** são apresentadas as várias ferramentas de validação que podem ser aplicadas no contexto da química analítica.



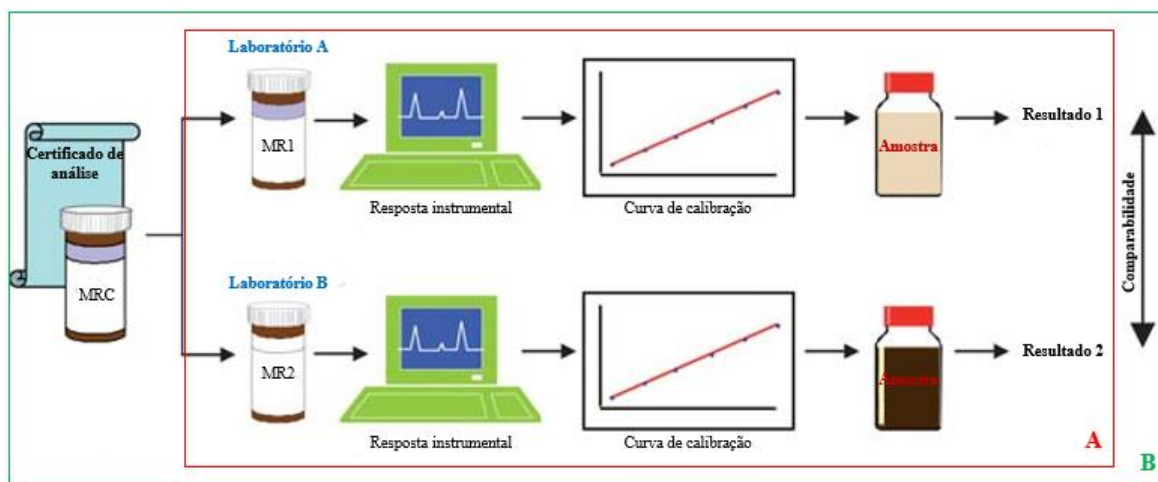
**Figura 21** – Ferramentas usadas tipicamente nos processos de validação de sistemas analíticos (Eurachem 2014).

Usando uma analogia simples, o processo de validação de um sistema analítico pode ser comparado à construção de um edifício, que, tal como a validação, terá de cumprir determinados requisitos definidos de acordo com a

aplicação a que se destina. Neste contexto, os parâmetros de validação poderão ser vistos como os tijolos. Para poder empilhar os tijolos e fixá-los uns aos outros é necessário, para além de muito trabalho, muitas ferramentas. A estatística pode ser vista como o cimento que permite fazer a ligação entre todos os elementos (“tijolos”) necessários. Portanto, para realizar a validação de um sistema analítico é necessário possuir alguns conhecimentos fundamentais de estatística. No contexto da validação, a estatística tem como principais utilidades a organização de dados, a sua representação em formas mais fáceis de interpretar e a tomada de decisões (com base em testes de significância estatística). Os padrões de medição constituem um outro tipo de ferramenta de validação importante. As normas, quando existentes, poderão ser vistas, retomando a analogia referida, como as instruções necessárias para a construção do edifício (planta realizada pelos arquitetos e orientações técnicas fornecidas pelos engenheiros civis), embora essas instruções possam não ser completamente seguidas, devido a limitações em termos de materiais/ferramentas. Os materiais de referência (MR) funcionam como fitas métricas, que permitem a medição de quão os resultados gerados pelo sistema analítico estão próximos daquilo que se sabe ser a

medida correta. Um MR é, essencialmente, um material com determinadas propriedades muito bem caracterizadas, constituindo uma referência metrológica (Eurachem 2014).

É importante fazer uma distinção entre MR e material de referência certificado (MRC), pois existem diferenças relevantes quanto à forma como esses materiais podem ser usados na validação. Os MR incluem qualquer material em que a propriedade de interesse é estável e homogênea, não sendo, no entanto, necessário, ao contrário do que acontece para os MRC, um alto grau de caracterização, rastreabilidade metrológica<sup>2</sup>, a expressão da incerteza e documentação associada. A caracterização dos MRC é feita de forma bastante mais exaustiva e controlada. Para além disso, os MRC são vendidos com um conjunto de documentos onde são apresentados os valores representativos das suas características e as incertezas associadas. Os MRC estão ainda integrados na cadeia de rastreabilidade metrológica. A caracterização deste tipo de materiais é feita recorrendo a vários métodos ou a um procedimento de medição primário<sup>3</sup>, o que confere grande confiança aos resultados obtidos (Eurachem 2014). A diferença entre os dois tipos de materiais referidos e a importância da rastreabilidade é demonstrada no exemplo representado na **Figura 22**.



**Figura 22 – Rastreabilidade e comparabilidade metrológicas.** Neste exemplo, dois laboratórios determinam a concentração de um mesmo analito numa amostra, recorrendo a uma curva de calibração obtida com padrões preparados a partir de MR (em que a concentração de analito é bem conhecida). São considerados dois cenários diferentes: **A:** Os resultados 1 e 2 não podem ser diretamente comparados, pois são rastreáveis a dois MR independentes e sem qualquer relação; **B:** Os resultados 1 e 2 podem ser comparados, uma vez que são rastreáveis a uma mesma referência (um MRC) (Barwick *et al.* 2010).

Sempre que tal seja possível, a validação de sistemas analíticos deverá ser realizada recorrendo a MRC que tenham o mesmo tipo de matriz e a mesma gama de concentração de

<sup>2</sup>Propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição.

<sup>3</sup>Procedimento de medição de referência utilizado para obter um resultado de medição sem relação com um padrão de uma grandeza da mesma natureza.

analito das amostras que serão analisadas em rotina com esse sistema. Um determinado MR ou MRC deverá ser usado para um único propósito durante a validação de um dado sistema analítico. Por exemplo, um MR que é usado para preparar os padrões de calibração não deverá ser usado para avaliar a existência de erros sistemáticos (Eurachem 2014).

Uma outra ferramenta de validação são os materiais adulterados. Esses materiais correspondem a amostras em que uma determinada substância está presente na amostra porque foi introduzida de forma externa; por exemplo, uma farinha que tenha sido obtida a partir de cereais sujeitos a tratamento com pesticidas. Note-se que estes tipos de amostras são diferentes das amostras reforçadas, no sentido em que o analito poderá estar mais fortemente ligado à matriz, o que terá consequências na aplicação do método analítico. A utilidade deste tipo de amostras para a validação depende de quão bem se consegue caracterizar o valor da concentração de analito existente (Eurachem 2014).

Uma das ferramentas mais usadas na validação são as amostras/soluções reforçadas (*spikes*). O reforço é a adição intencional do analito ou de outra substância de interesse. Como a amostra a reforçar poderá conter já algum analito, a adição terá de ser feita com cuidado, para que a concentração final de analito não exceda o valor máximo de concentração do sistema analítico validado, i.e. a concentração obtida não deve ser superior ao máximo da gama de trabalho. A forma como a adição de analito é feita origina normalmente a formação de ligações entre o analito e a matriz mais fracas do que as que ocorrem quando o analito está naturalmente presente. Portanto, a estimativa de erros sistemáticos através da realização de testes de recuperação, recorrendo a *spikes*, poderá ser irrealista. O reforço de uma determinada amostra poderá não passar unicamente pela adição de analito. Por exemplo, poderá adicionar-se à amostra quantidades variáveis de um determinado interferente, a fim de identificar a partir de que concentração de interferente a concentração de analito é afetada significativamente (Eurachem 2014).

Os brancos são soluções em que o analito não está presente e permitem avaliar a intensidade de sinal analítico atribuível ao analito e a que é atribuível a outros constituintes da amostra. Distinguem-se dois tipos principais de brancos (Eurachem 2014):

- Branco de reagentes – Reagentes que são adicionados à amostra ao longo do método analítico (incluindo solventes para dissolução ou extração);
- Branco de amostra – Matriz da amostra sem o analito, por exemplo, urina sem qualquer vestígio de uma substância dopante que se pretende quantificar.

Frequentemente, é impossível obter um branco de amostra. Contudo, sempre que possível, esse branco deverá ser usado para obter uma estimativa mais realista do tipo de interferências que poderão ser encontradas ao aplicar rotineiramente o sistema analítico avaliado.

Por fim, os ensaios em amostras de rotina poderão constituir também uma ferramenta de validação interessante, pois podem fornecer informação importante relativamente, por exemplo, à precisão e às interferências que podem ser encontradas diariamente nas análises de rotina, usando o sistema analítico que se pretende validar (Eurachem 2014). As cartas de controlo constituem uma ferramenta estatística interessante para avaliar os resultados obtidos em ensaios deste tipo.

- **Parâmetros de validação**

- **Seletividade e sensibilidade**

De acordo com a 3ª edição do VIM (Cruz *et al.* 2012), a seletividade é definida da seguinte forma: “propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para uma ou várias mensurandas, tal que os valores de cada mensuranda sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenómeno, corpo ou substância em estudo”. No caso da aplicação em química analítica, podemos defini-la da seguinte forma (Vessman *et al.* 2001, Eurachem 2014): “extensão em que um determinado método pode ser usado para determinar analitos específicos (mensurandas), numa determinada matriz, sem interferências de outros componentes com comportamento semelhante”.

Embora muitos documentos usem os termos “seletividade” e “especificidade” de forma indistinta, a IUPAC desaconselha o uso desse último termo (Vessman *et al.* 2001).

A falta de seletividade num determinado sistema analítico de medição é geralmente causada pela existência de interferências, que produzem um erro (sistemático) de justeza (*bias*) no resultado de medição obtido. Os efeitos de interferência de matriz são, na maioria, proporcionais ao sinal obtido (interferências proporcionais ou rotacionais), o que provoca uma alteração do declive da curva de calibração (sensibilidade). Interferências fixas ou translacionais são independentes da concentração de analito, influenciando, por isso, apenas a ordenada na origem da curva de calibração (**Figura 23**). Frequentemente, ambos os tipos de interferências estão presentes (Eurachem 2014). As estratégias a adotar para resolver estes problemas podem passar pela realização de testes de recuperação ou pela utilização do

método (de calibração) da adição de padrão para interferências proporcionais, e testes de brancos para interferências fixas (Miller *et al.* 2010).

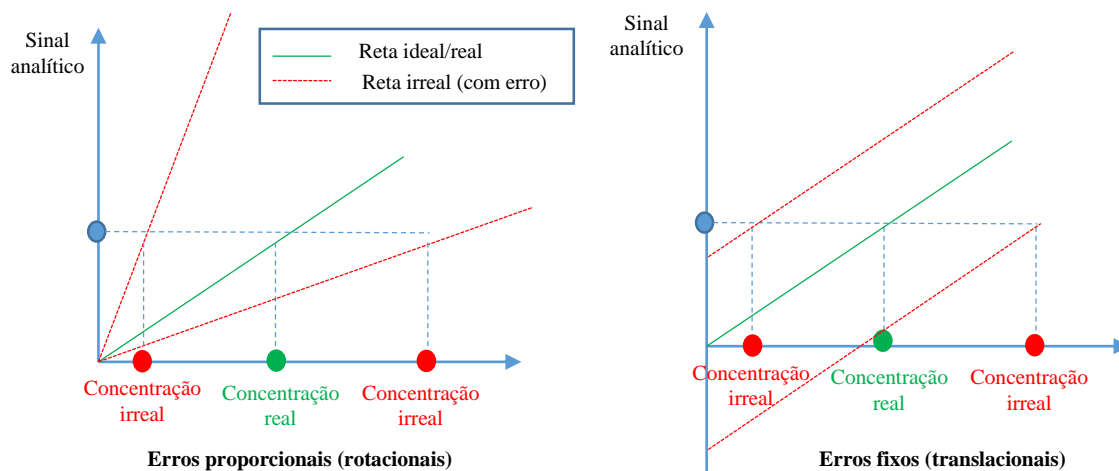


Figura 23 – Efeitos proporcionais (variação do declive da função de calibração) e efeitos fixos (variação da ordenada na origem da função de calibração) no erro da concentração calculada com a função de calibração

Relativamente à sensibilidade, esta é definida na 3ª edição do VIM (Cruz *et al.* 2012) da seguinte forma: “quociente entre a variação de uma indicação de um sistema de medição e a variação correspondente do valor da grandeza medida”. Na prática, a sensibilidade corresponde ao declive da curva de calibração (sensibilidade de calibração). Se essa curva for linear, então a sensibilidade de calibração será constante (independente da concentração). Para uma avaliação mais exigente do potencial de quantificação, a sensibilidade deverá ter em conta o ruído instrumental, que poderá ter grande influência na zona de mais baixas concentrações. Por esse motivo, a sensibilidade do método é normalmente avaliada recorrendo à sensibilidade analítica, que corresponde à divisão da sensibilidade de calibração pelo desvio-padrão do sinal analítico obtido para uma determinada concentração (Skoog *et al.* 2013). Idealmente, a sensibilidade associada ao sistema analítico deverá ser a maior possível, o que permite uma maior discriminação de amostras com pequenas diferenças na concentração de analito, devido à maior diferença entre os respetivos sinais analíticos.

#### ○ Gama de trabalho e limiares analíticos

A gama de trabalho e os limiares analíticos são frequentemente avaliados recorrendo aos dados da curva de calibração, de acordo com a abordagem que é apresentada normalmente nos livros de química analítica. Contudo, no contexto da validação de sistemas analíticos, estas características de desempenho enquadram-se em duas classes: parâmetros instrumentais e parâmetros metodológicos (Eurachem 2014).



Os parâmetros instrumentais são aqueles que podem ser obtidos a partir da curva de calibração instrumental. Os parâmetros metodológicos referem-se ao método global e são particularmente importantes em metodologias cujos resultados dependam, para além da resposta instrumental, das etapas de preparação da amostra. São exemplo as etapas de extração, pois a eficiência do processo terá uma grande influência na concentração determinada (Eurachem 2014).

Dois aspetos importantes que deverão ser conhecidos para poder aferir o potencial do sistema analítico em avaliação durante um processo de validação são (Eurachem 2014):

- A concentração mínima de analito que pode ser detetada usando o método considerado, com um determinado nível de confiança – Limite de deteção<sup>4</sup> (LD);
- A concentração mínima de analito para a qual o desempenho do método é aceitável para a aplicação pretendida, i.e. a concentração de analito é determinada com a exatidão desejável – Limite de quantificação<sup>5</sup> (LQ)

Os LD e LQ instrumentais podem ser diretamente determinados recorrendo à análise de brancos, à razão sinal-ruído instrumental ou aos parâmetros da curva de calibração. Relativamente ao cálculo do LQ metodológico, este pode ser realizado usando amostras que tenham sido sujeitas a todo o tratamento que é aplicado às amostras nas quais efetivamente se pretende quantificar o analito. O LQ metodológico corresponde ao valor mínimo para o qual se verifica que o valor de concentração calculado corresponde ao valor verdadeiro de concentração. Tanto o LD como o LQ instrumentais são geralmente determinados recorrendo à multiplicação do desvio-padrão obtido na realização de várias réplicas na análise de brancos por um fator adequado (geralmente, o fator é 3 para o LD e 10 para o LQ). As amostras que são consideradas como sendo adequadas para a determinação do LD e LQ são aquelas em que o analito está ausente (brancos) ou em que a sua concentração não é detetável (encontra-se abaixo ou próxima do LD). No caso de técnicas de espectroscopia atômica, a análise de brancos é uma boa estratégia de determinação do LD e do LQ. No entanto, algumas técnicas analíticas estão dependentes da deteção de um sinal distinguível do ruído instrumental. Um exemplo disso é a cromatografia, em que é necessário conseguir

---

<sup>4</sup>De acordo com a 3ª edição do VIM, o LD é definido como: “valor medido, obtido por um procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um constituinte num material é  $\beta$ , sendo  $\alpha$  a probabilidade de declarar falsamente a sua presença”. Ainda de acordo com essa fonte, a IUPAC recomenda valores por defeito de  $\alpha$  e  $\beta$  iguais a 0,05.

<sup>5</sup>A 3ª edição do VIM não apresenta qualquer definição para o LQ.

distinguir um pico, e em que será necessário calcular os LD e LQ recorrendo a amostras em que o analito esteja presente, embora com uma concentração muito baixa (Eurachem 2014).

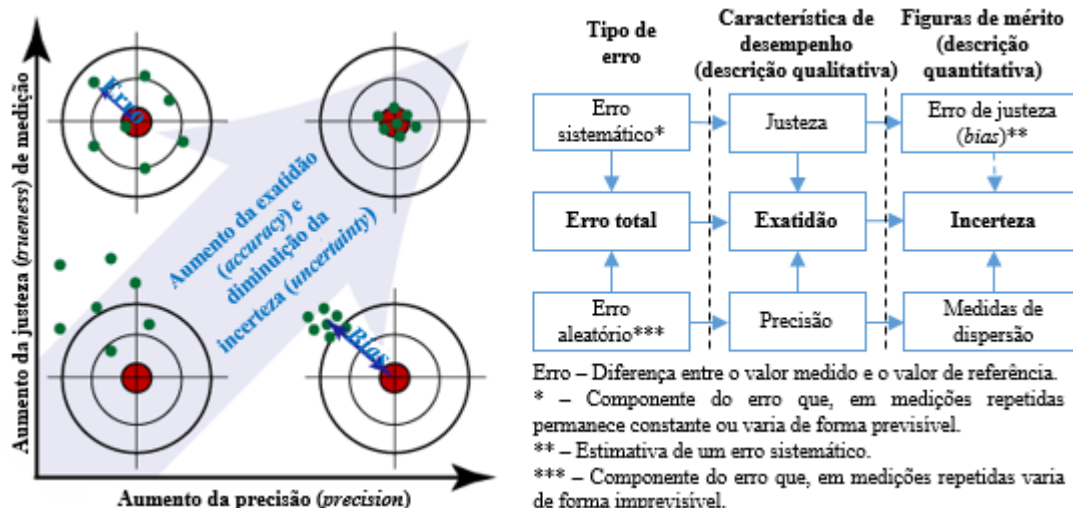
De forma simplificada, a gama de trabalho, que no VIM é chamada de “intervalo de medição”, corresponde ao intervalo em que o sistema analítico avaliado produz resultados com uma incerteza aceitável. A gama de trabalho instrumental é o intervalo de concentrações do analito em que o instrumento de medição usado tem o comportamento pretendido (geralmente, a preferência é que este seja linear). Em termos práticos, esse intervalo é geralmente definido recorrendo a uma curva de calibração, em que os limites inferior e superior do intervalo correspondem, respetivamente, aos limites instrumentais de quantificação e de linearidade (LL). O limite superior é, portanto, definido como o valor de concentração de analito para o qual o declive da curva de calibração (sensibilidade) varia significativamente, i.e. deixa de se verificar a linearidade.

Relativamente à gama de trabalho metodológica, esse intervalo pode ser determinado construindo um gráfico da concentração medida em função da concentração real de analito nas amostras analisadas. Portanto, para determinar este tipo de gama de trabalho é necessário recorrer a amostras cuja concentração de analito seja rigorosamente conhecida. Recorrendo a essa estratégia, a gama de trabalho do método será aquela em que a concentração determinada não é significativamente diferente da concentração real conhecida. A gama de trabalho de cada sistema analítico deve ser estabelecida de forma específica para cada matriz. Mesmo que o método usado seja exatamente igual para duas matrizes diferentes, a gama de trabalho poderá ser diferente para cada matriz, pois as interferências associadas e a capacidade do método para extrair/recuperar o analito poderão variar com a matriz da amostra (Eurachem 2014).

- **Exatidão (justeza, precisão e incerteza)**

Neste trabalho serão usados os termos “justeza”, “precisão” e “incerteza” para referir a “exatidão” das medições obtidas com um determinado sistema analítico. Esses termos estão associados aos tipos de erros que poderão ocorrer durante a realização de um determinado método analítico: erros sistemáticos, erros aleatórios e erros grosseiros. Devido a alterações do significado de alguns destes termos nos últimos anos, verifica-se que existe alguma confusão no seu uso. Uma descrição mais detalhada sobre as diferenças existentes entre os termos referidos pode ser consultada no VIM.

Com base na informação apresentada na **Figura 24**, a avaliação da exatidão de um determinado sistema analítico envolve a avaliação de duas outras componentes: a justeza e a precisão. Os valores obtidos nessas duas avaliações podem ser combinados num único valor, a incerteza, que constitui uma estimativa da exatidão.



**Figura 24** – Ilustração da distinção e das relações existentes entre alguns dos conceitos mais usados em metrologia química. Note-se que a ilustração clássica da exatidão e da precisão em termos de um padrão de tiros num alvo não descreve corretamente a exatidão, provocando uma confusão entre os conceitos de “justeza” e de “exatidão”. A exatidão está relacionada com uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos e não apenas com os erros sistemáticos, como é tipicamente referido. Note-se ainda que a avaliação da incerteza, de acordo com o “Guia para a expressão da incerteza de medição” (“Guide to the expression of uncertainty in measurement” – GUM) pressupõe a correção para o erro de justeza conhecido. A incerteza dessa correção ( $u_{bias}$ ), que se deve ao facto de não ser possível conhecer perfeitamente o erro sistemático, é incluída na declaração final da incerteza. Para além disso, a declaração final de incerteza deverá ser representativa do erro aleatório e sistemático, não incluindo os erros grosseiros (devidos a ignorância do operador, reagentes em mau estado de conservação ou contaminados, trocas de reagentes, material mal lavado, etc.) (Menditto *et al.* (2007), Eurachem (2014), Cruz *et al.* (2012), BIPM *et al.* (2008a) e [12].

Relativamente à justeza, esta é, de acordo com a 3ª edição do VIM, o “grau de concordância entre a média dum número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência” (Cruz *et al.* 2012). Como é impossível executar um número infinito de medições, a justeza não pode ser medida, mas é possível fazer uma estimativa dessa característica de desempenho, recorrendo ao “erro de justeza”. Uma estimativa do erro de justeza baseia-se na comparação do valor médio de um conjunto de valores de medição, obtidos com o sistema analítico em avaliação, e um determinado valor de referência. Existem três abordagens diferentes para a realização desta tarefa (Eurachem 2014): (1) análise de materiais de referência (MR), (2) ensaios de recuperação (usando amostras reforçadas) e (3) comparação dos resultados obtidos usando um outro método analítico de referência (cruzamento de métodos), preferencialmente com um procedimento de medição primário. A escolha da abordagem que deverá ser usada depende dos meios disponíveis. Preferencialmente, deverão ser usados MRC com o mesmo tipo de matriz e gama de

concentrações previstas para as amostras, mas estes podem não estar disponíveis, o que obriga a adotar pelo menos uma das outras duas estratégias possíveis (Eurachem 2014).

A avaliação da outra componente da exatidão, a precisão, deverá ser realizada através da realização de várias réplicas de um mesmo tipo de medição. Preferencialmente, as várias réplicas deverão ser executadas em amostras, para que a influência dos efeitos de matriz esteja incluída na estimativa da precisão (RELACRE 2000). As experiências envolvendo a realização de várias réplicas devem ser idealizadas para que traduzam as condições de variabilidade previsíveis para a aplicação do sistema analítico em análises de amostras de rotina, e não as condições de variabilidade mínima. De acordo com a 3ª edição do VIM (Cruz *et al.* 2012), a precisão é o “grau de concordância entre valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas”. O termo mais importante nesta definição é “condições especificadas”, pois a forma de cálculo e a interpretação das medidas de dispersão obtidas estarão dependentes das condições nas quais foram realizadas as experiências de análises de réplicas. As condições de repetibilidade e reprodutibilidade correspondem aos dois extremos de variabilidade, mínima e máxima, respetivamente. Existe ainda uma outra situação, que corresponde às condições de precisão intermédia, em que a variabilidade associada é superior à verificada nos resultados obtidos em condições de repetibilidade, mas inferior à verificada nos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade. Na **Tabela 3** são apresentadas, de forma resumida, as diferenças associadas a cada uma das condições de precisão referidas. Ao avaliar a precisão, é importante que as condições de variabilidade sejam inequivocamente identificadas, com indicação dos fatores variados, procurando estimar a variabilidade associada a todas as condições que poderão alterar-se ao usar o sistema analítico avaliado de forma rotineira (Eurachem 2014).

**Tabela 3 – Distinção entre os diferentes tipos de condições de precisão que deverão ser considerados na validação de um sistema analítico (assim como no seu uso rotineiro) (RELACRE 2000, Cruz *et al.* 2012, Eurachem 2014).**

Parâmetro	Condições de precisão		
	Repetibilidade	Precisão intermédia	Reprodutibilidade
<b>Variações entre réplicas de uma mesma análise</b>			
<b>Sistema analítico</b>	O mesmo (mas com diferentes condições de precisão)		
<b>Local</b>	O mesmo laboratório		Diferentes laboratórios
<b>Analista/operador</b>	Não variam	Pelo menos um destes varia (no caso do tempo, deverão ser usados intervalos relativamente longos)	Todos estes variam (no caso do tempo, deverão ser usados intervalos relativamente longos)
<b>Equipamentos e materiais</b>			
<b>Tipo de reagentes</b>			
<b>Intervalos de tempo</b>	Curtos		

Uma vez que, quase sempre, o desvio-padrão dos valores obtidos na análise de várias réplicas de uma mesma amostra aumenta com o aumento da concentração de analito, é necessário escolher várias concentrações, dentro da gama de trabalho definida, para calcular o desvio-padrão. Idealmente, poderá calcular-se uma função que relacione o desvio-padrão com a concentração de analito. O número mínimo de réplicas que deverá ser realizado varia de protocolo para protocolo. As réplicas deverão ser independentes, i.e. todo o método analítico, incluindo as etapas de preparação da amostra, deverá ser realizado em cada uma das réplicas. A análise de variância (ANOVA) é uma das ferramentas matemáticas mais usadas para a avaliação da precisão de sistemas analíticos. As variâncias calculadas durante o processo de avaliação da precisão permitem estabelecer limites de precisão (de repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia), ou seja, valores que permitem decidir, com um determinado nível de confiança, se existe uma diferença significativa entre os resultados obtidos na análise de duas réplicas nas mesmas condições de precisão. Considera-se que existem diferenças significativas quando a diferença absoluta entre dois valores, obtidos nas mesmas condições de precisão, é superior ao valor calculado para o limite de precisão (Eurachem 2014). Caso se verifique que o limite de precisão é ultrapassado, deverá ser feita uma análise crítica e, eventualmente, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas, nomeadamente as normas ISO da série 5725. Essas normas indicam, entre outras informações, formas de calcular limites de precisão considerando mais de dois resultados de análises de réplicas (RELACRE 2000, Eurachem 2014).

De acordo com a 3ª edição do VIM, a incerteza de uma medição é definida como um “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda, com base nas informações (disponíveis) utilizadas”. Embora, em termos rigorosos, a incerteza não seja uma característica de desempenho de um sistema analítico, mas sim uma propriedade dos resultados obtidos usando esse sistema de medição, é possível proceder à sua estimativa recorrendo aos dados recolhidos na validação, e esse parâmetro constitui, como já foi referido, uma forma de se quantificar a exatidão do sistema analítico avaliado. Existem várias formas de calcular a incerteza, distinguindo-se duas abordagens principais: “*bottom-up*” (“de baixo para cima”) e “*top-down*” (“de cima para baixo”). De forma simplificada, a primeira abordagem consiste em identificar todas as características do sistema analítico que podem contribuir para a incerteza do resultado final, estimar as

contribuições de cada uma, atribuindo-lhe um valor numérico, e combinar estas de forma a obter um valor final. A segunda abordagem visa simplificar a estimativa da incerteza, reduzindo a quantidade de cálculos necessários, através do agrupamento de alguns termos de incerteza num termo único. Por exemplo, um termo de incerteza associado à precisão que corresponda à contribuição de várias fontes de incerteza. Portanto, na abordagem “*top-down*” o número total de termos a considerar na estimativa da incerteza global torna-se menor. Cada uma das estratégias tem as suas vantagens e desvantagens e a escolha da estratégia mais adequada depende das características do sistema analítico considerado. Uma descrição mais detalhada do conceito de incerteza e da forma de proceder ao seu cálculo e apresentação pode ser encontrada nas últimas edições do GUM (JCGM 100:2008) e no seguinte guia da Eurachem: “*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*”.

Neste trabalho, optou-se por adotar uma estratégia de estimativa da incerteza do tipo “*top-down*”, como descrito no capítulo 3 deste documento.

- **Robustez**

A robustez é também um termo que gera confusões por não estar ainda bem definido. Essa confusão torna-se mais acentuada consultando a literatura em inglês, uma vez que são usados dois termos diferentes: “*ruggedness*” e “*robustness*”. Alguns autores usam esses dois termos como sinónimos, enquanto outros fazem uma distinção entre estes. Verifica-se que este termo não está definido na 3ª edição do VIM (Cruz *et al.* 2012) e a IUPAC, a ISO e outros organismos do mesmo tipo, também não definiram ainda esse termo de forma clara, existindo mesmo contradições entre dois documentos da IUPAC: em Curie (1995) é transmitida a ideia de que a robustez (*ruggedness*) pode ser avaliada recorrendo a estudos de comparação interlaboratorial, enquanto em Thompson *et al.* (2002) essa avaliação é limitada a um estudo intralaboratorial. Uma revisão do conceito de robustez e dos termos associados é feita em Burns *et al.* (2009). Nesse artigo, que foi elaborado com apoio da IUPAC, propõe-se que o termo “*robustness*” remeta apenas para uma variação intralaboratorial de parâmetros experimentais, enquanto o termo “*ruggedness*” esteja associado à insensibilidade do sistema analítico relativamente a alterações inadvertidas de parâmetros experimentais e a variações interlaboratoriais. O guia da Eurachem referente à validação de métodos (sistemas) analíticos que foi usado como referência neste trabalho recorre a uma definição apresentada em 2005 pela ICH (“*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*”) (ICH 2005), que é semelhante à definição apresentada

no Guia 13 da RELACRE (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal) (RELACRE 2000). De acordo com essas referências, pode-se dizer que a robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se os resultados que gera forem pouco influenciados por variações que possam ocorrer durante a sua execução.

A robustez fornece uma medida da confiabilidade do sistema analítico para o seu uso regular. Para avaliar a robustez de um dado sistema analítico, deverá proceder-se à variação deliberada dos parâmetros experimentais de interesse. Alguns exemplos de parâmetros experimentais que poderão ser variados para avaliar a sua influência no desempenho global do sistema analítico a validar são a temperatura, o pH e a pressão. Uma possível estratégia para avaliar o resultado dessa alteração é o *design experimental* (análise fatorial), que permite a variação simultânea de vários parâmetros experimentais e o estudo da sua influência no desempenho global do método e do tipo de interações existentes entre eles (RELACRE 2000, Thompson *et al.* 2002, Eurachem 2014). Contudo, poderá também recorrer-se a abordagens em que se altera uma variável de cada vez, mas essa abordagem, embora possua um tratamento estatístico mais fácil que os métodos multivariados, não permite averiguar se existem interações entre parâmetros experimentais (Thompson *et al.* 2002).





### **3. Trabalho laboratorial**



### 3.1. Lavagem de material

Como as técnicas de ICP possuem elevada sensibilidade e alguns elementos químicos se encontram em quantidades vestigiais no cabelo, é fundamental evitar a introdução de contaminações nas amostras. Assim, o material usado ao longo de todo o processo analítico deve encontrar-se devidamente limpo. O LCA possui um documento interno onde são definidos detalhadamente os processos de lavagem dos materiais usados no serviço de ICP. Os procedimentos de lavagem adotados neste trabalho tiveram como referência esse documento, tendo a lavagem do material de vidro e de plástico sido realizada de acordo com as seguintes etapas:

1. Lavagem inicial com esponja e solução de detergente Decon a 5% (v/v) (percentagem conforme indicações do fabricante) e passagem por água da torneira;
2. Imersão em solução de detergente Decon a 5% (v/v), durante pelo menos 24 horas, e passagem por água da torneira;
3. Imersão em solução de  $\text{HNO}_3$  50% (v/v), durante pelo menos 24 horas;
4. Passagem por água pura Elix (resistividade de  $15 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  – água do tipo 2);
5. Secagem à temperatura ambiente num tabuleiro de plástico revestido com papel absorvente e com as aberturas dos recipientes viradas para baixo (para facilitar o escoamento da água e evitar a introdução de poeiras no interior do recipiente).

Para a lavagem dos vasos de micro-ondas de *teflon* (politetrafluoretileno – PFA), foi usado o seguinte procedimento de lavagem:

1. Passagem por solução de detergente Decon a 5% (v/v) e por água da torneira;
2. Adição de 10 a 20 mL de solução aquosa de  $\text{HNO}_3$  a 50% (v/v) a cada um dos vasos de micro-ondas e execução do programa de aquecimento de micro-ondas adequado para a lavagem (o programa a executar depende do tipo de vaso de micro-ondas e do tipo de material que foi digerido pela última vez);
3. Passagem por água pura Elix;
4. Secagem à temperatura ambiente num tabuleiro de plástico revestido com papel absorvente e com as aberturas dos recipientes viradas para baixo.

### 3.2. Determinação de elementos químicos em cabelo

Para as matrizes em que o LCA apresenta métodos de ensaio acreditados (águas e solos), existem normas ISO que descrevem procedimentos para a quantificação de elementos químicos nessas matrizes recorrendo às técnicas de ICP-OES (ISO 11885:2007 e ISO

22036:2008) ou ICP-MS (ISO 17294:2004 e ISO/TS 16965:2013). Outras organizações internacionais, tais como a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) e a *American Society for Testing and Materials* (ASTM) criaram também documentos normativos referentes a esse tipo de análise.

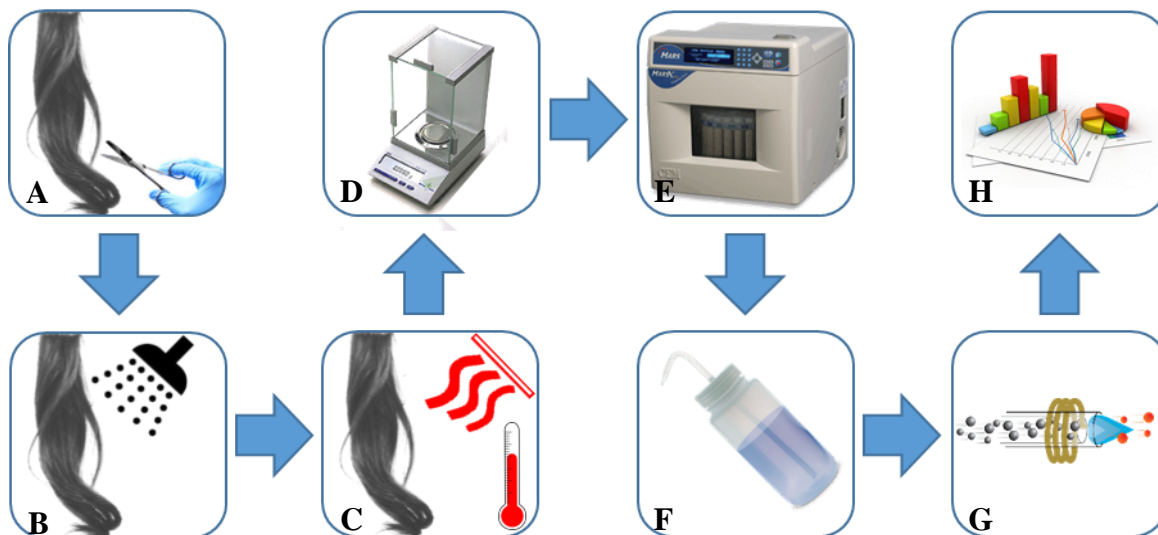
Ao contrário do que se verifica para as matrizes referidas no parágrafo anterior, não existem normas que definam um procedimento para a quantificação de elementos com técnicas de ICP no cabelo. Assim, este trabalho não consistiu somente na validação de uma metodologia analítica para a quantificação de elementos em cabelo, mas também no seu desenvolvimento.

Como indicado anteriormente, no mais recente guia da Eurachem referente à validação (Eurachem 2014), é referido que a validação de um método analítico terá de ser precedida pelo seu desenvolvimento (quando este não se encontra normalizado). De acordo com esse guia, as etapas de desenvolvimento e validação de um método (sistema) analítico acabam por estar fortemente ligadas, pois muitas das características de desempenho podem ser avaliadas durante a fase de desenvolvimento. Esta foi a abordagem que se tentou utilizar neste trabalho.

Como referido na secção introdutória, muitos laboratórios centram o âmbito da validação na técnica de quantificação, não incluindo as etapas de amostragem e preparação de amostras. Esse tipo de abordagem possui o inconveniente de não avaliar devidamente as etapas que antecedem a quantificação e que normalmente são a maior fonte de incerteza. Contudo, como também já foi referido, esta estratégia acaba por ser compreensível, tendo em conta que a frequentemente avaliação da influência das etapas de preparação da amostra e a definição dos melhores métodos para concretizar cada uma dessas etapas é um assunto complexo, moroso e pouco consensual.

Como normalmente o objetivo associado à análise de cabelo é a quantificação de elementos depositados endogenamente, minimizando a influência dos depositados exogenamente, a validação das etapas de preparação da amostra para concretização desse objetivo não é simples, devido à dificuldade em determinar a proveniência endógena ou exógena dos elementos químicos presentes no cabelo. Por esse motivo, o âmbito da validação realizada neste trabalho centrou-se na etapa de quantificação por ICP-MS e no método de digestão.

Na **Figura 25** é apresentado um esquema das várias etapas do procedimento que é usado normalmente na análise química de cabelo com técnicas de ICP, e que foi também adotado neste trabalho.



**Figura 25** – Esquema das várias etapas do procedimento global de análise de amostras de cabelo com técnicas de ICP. **A:** Recolha e armazenamento; **B:** Lavagem; **C:** Secagem (e armazenamento em exsiccador); **D:** Homogeneização e determinação da massa de amostra para análise; **E:** Digestão; **F:** Recolha, diluição e armazenamento das soluções obtidas após a digestão; **G:** Análise das soluções por ICP; **H:** Análise e interpretação dos resultados.

Por se tratar de uma matriz biológica, o cabelo possui alguma complexidade, exigindo por isso um procedimento com várias etapas de preparação da amostra para a análise (etapas A a E da **Figura 25**).

### 3.2.1. Amostras de cabelo usadas neste trabalho

Foram usados dois tipos de amostras de cabelo neste trabalho: materiais de referência certificados (MRC) e amostras reais, que, por possuírem características diferentes, permitem a avaliação de diferentes características de desempenho do sistema analítico estudado. Na **Tabela 4** é apresentada uma comparação desses dois tipos de amostras.

**Tabela 4** – Comparação dos dois tipos de amostras de cabelo consideradas neste trabalho: MRC e amostras reais

Atributos/Tipos de amostra		MRC	Amostras reais
Concentração de vários elementos		Conhecidas: valores certificados (incluem estimativa da incerteza) ou informativos (não incluem estimativa da incerteza)	Desconhecidas
Extensão do cabelo		Cabelo pulverizado	Cabelo com alguns centímetros de comprimento
Etapas do método analítico	Recolha, lavagem, secagem, trituração e homogeneização	Da responsabilidade da entidade certificadora, no âmbito do processo de certificação dos valores de concentração dos vários elementos considerados	Realizado no LCA, com a possível exceção da etapa de recolha, que, para algumas amostras, foi realizada em salões de cabeleireiros
	Digestão	Etapas realizadas no LCA e de forma idêntica para ambos os tipos de amostra.	
	Quantificação		

No caso dos MRC de cabelo, as etapas de recolha, lavagem, trituração e homogeneização são efetuadas pelo organismo que prepara e comercializa o material. Assim, as amostras deste tipo podem ser diretamente digeridas e analisadas, sendo apenas necessário seguir as recomendações referentes à preparação do material, que fazem parte das instruções que acompanham os respetivos certificados de análise [13,14].

Neste trabalho foram usados dois MRC de cabelo:

- ERM DB001 – MRC produzido sob a coordenação do *Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements*, um dos institutos da Comissão Europeia.
- GBW 09101b – MRC produzido pelo *Shanghai Institute of Nuclear Research of the Chinese Academy of Sciences*.

A opção pela utilização de dois MRC é justificada pelo facto do número de elementos com concentrações certificadas ser maior no GBW 09101b, mas ser maior o prestígio das instituições que deram origem ao ERM DB001, o que justifica o seu preço mais elevado, apesar de este conter uma menor quantidade de cabelo e um número reduzido de elementos com concentração certificada. Para além disso, a utilização de dois MRC permite uma avaliação mais exigente da exatidão associada ao sistema analítico estudado neste trabalho.

Na **Tabela 5** são apresentadas as recomendações referentes aos dois MRC de cabelo usados. No caso das amostras reais, todas as etapas de preparação da amostra (com a possível exceção da etapa de recolha) foram realizadas no LCA.

**Tabela 5 – Recomendações que deverão ser seguidas na preparação dos MRC de cabelo para a respetiva análise [13,14]**

Requisito\MRC		ERM DB001	GBW 09101b
Armazenamento		Num exsiccador, a $18\pm 5^{\circ}\text{C}$ e protegido da luz	Num exsiccador
Homogeneização		Agitação intensa (com inversão sucessiva do frasco), durante pelo menos 2 minutos, antes de cada abertura	Sem especificações
Secagem	Porção mínima	200 mg (porção independente das usada para avaliar o método)	200 mg (não é especificado se deverá ser uma porção independente da usada para avaliar o método)
	Temperatura	$105\pm 2^{\circ}\text{C}$	$80^{\circ}\text{C}$
	Critério	A diferença entre duas pesagens independentes da porção que é seca não deve exceder os 0,2 mg.	Pelo menos 4 horas de secagem
Porção mínima para análise		200 mg para As, Cd, Cu, Pb, Se, Zn e 50 mg (Hg)	200 mg

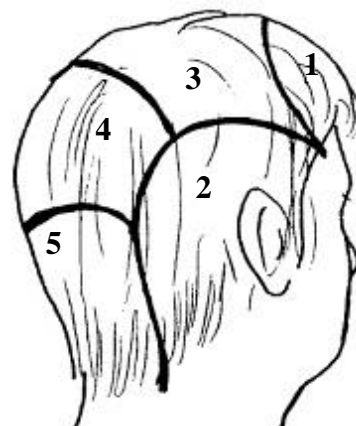
Relativamente ao outro tipo de amostras de cabelo indicado na **Tabela 5**, as amostras reais, o adjetivo “reais” é empregue para demonstrar que esse tipo de amostras possui

características similares às amostras que poderão ser analisadas em rotina, após a validação do sistema analítico.

### 3.2.2. Recolha e armazenamento das amostras

A amostragem de cabelo é a primeira etapa do método analítico e a mais importante, pois condiciona todas as conclusões subsequentes. Independentemente da qualidade de todas as etapas de tratamento da amostra e quantificação realizadas após a amostragem, o problema analítico ao qual se pretende dar resposta não poderá ser resolvido se as amostras sujeitas à análise não forem representativas desse problema. Foram analisadas amostras de cabelo recolhidas ao longo do período em que decorreu esse Estágio, mas também algumas que se encontravam já armazenadas no LCA, provenientes de trabalhos desenvolvidos anteriormente. Procurou-se seguir os procedimentos indicados com maior frequência na literatura, optando pela recolha de amostras de cabelo que não fosse pintado, na zona posterior da cabeça (nuca e/ou vértex posterior) e o mais próximo possível da pele da cabeça.

A opção pela zona posterior da cabeça (nuca e/ou vértex posterior) (**Figura 26**) para a recolha da amostra é justificada pela menor suscetibilidade desta zona da cabeça a contaminações externas, menor variabilidade na velocidade de crescimento das fibras, menor variação do rácio entre o número de cabelos nas fases da anagénes e telogénese, presença de cabelos nessa zona mesmo em indivíduos calvos, menor impacto estético, e menor variabilidade associada aos



**Figura 26 – Regiões do couro cabeludo.**  
1: Frontal, 2: Temporal; 3: Vértex anterior, 4: Vértex posterior, 5: Nuca (Katz *et al.* 1988)

fatores relacionados com a idade e o sexo do dador (Kintz 2004, Pereira *et al.* 2012). Alguns investigadores reportaram a existência de variações significativas na distribuição de alguns elementos ao longo do couro cabeludo (Cornelis 1973, Obrusnik *et al.* 1973, Frazão 2008) e, portanto, a recolha de porções de cabelo de várias zonas da cabeça e a sua combinação na obtenção de uma única amostra, uma estratégia de amostragem adotada em algumas publicações referentes à quantificação de substâncias químicas em cabelo, é uma abordagem que, sempre que possível, deverá ser evitada, pois contribui para a heterogeneidade da amostra.

As amostras que já estavam armazenadas no laboratório aquando do início deste Estágio foram obtidas em salões de cabeleireiros. Embora os cabeleireiros tenham sido

aconselhados quanto à zona da cabeça onde deveria ser realizada a amostragem, não se pode garantir que a recolha das amostras tenha sido realizada de acordo com essas recomendações.

A literatura referente à análise de elementos químicos em cabelo humano não é consensual relativamente à massa de amostra necessária para análise, da qual dependerá a quantidade de amostra recolhida. As técnicas destrutivas, nomeadamente as técnicas de ICP requerem uma quantidade significativa de amostra (50-200 mg) (Blume-Peytavi *et al.* 2008), mas as técnicas não-destrutivas, como a análise por ativação com neutrões (NAA) e a análise por energia dispersiva de raio-X (EDS ou EDX), permitem a análise de uma única fibra de cabelo, requerendo a uma menor quantidade de amostra (Blume-Peytavi *et al.* 2008).

Deverá procurar-se que o processo de amostragem não introduza contaminações significativas. Assim, é recomendável que a recolha da amostra seja realizada com luvas e tesouras de aço inoxidável de alta qualidade ou (idealmente) de material cerâmico (Bencze 1994, Pereira *et al.* 2012). No caso das amostras de cabelo recolhidas durante o período em que decorreu o Estágio, essa recolha foi realizada com uma tesoura de aço inoxidável e luvas. Para as amostras provenientes de salões de cabeleireiros, não é possível garantir que o corte de cabelo não tenha introduzido contaminações significativas, pois nesses casos não foram usadas luvas e foi usado o material de corte existente nos salões.

Todas as amostras de cabelo usadas neste trabalho foram armazenadas em sacos de plástico adequados à conservação de alimentos ou em pequenos tubos de plástico devidamente selados (**Figura 27**), num armário, protegidos da luz e à temperatura ambiente.



**Figura 27** – Formas de armazenamento das amostras de cabelo. **A:** Em saco de plástico para conservação de alimentos selado; **B:** Em tubo de plástico selado.

### 3.2.3. Lavagem

A suscetibilidade para contaminações do cabelo humano implica a necessidade de incluir no método analítico uma etapa de lavagem. De entre os vários métodos de lavagem indicados na literatura, optou-se neste trabalho por usar o método proposto pela IAEA (Ryabukhin 1976, Cortes Toro *et al.* 1993), já referido na secção introdutória deste trabalho.



Embora exista alguma contestação em torno da adequabilidade deste método de lavagem, este é o mais usado nas várias publicações referentes à análise de elementos químicos em cabelo. Sucintamente, este método de lavagem consiste no contacto sucessivo, por períodos intercalados de 10 minutos, da amostra de cabelo com acetona e água. Contudo, considerando o relatório original da IAEA (Ryabukhin 1976) e o artigo de Cortes Toro *et al.* (1993), nenhuma fonte bibliográfica define claramente a quantidade de amostra de cabelo a usar. Quanto ao volume de solvente, em Ryabukhin (1976) é indicado um volume de 25 mL, enquanto em Cortes Toro *et al.* (1993) é referido que o volume de solvente a usar deverá cobrir completamente a amostra. Seria importante que estas especificações do processo fossem apresentadas de forma mais clara, tendo em conta que a lavagem é um processo de extração (idealmente, de contaminantes exógenos) e, como tal, a sua eficiência dependerá, para além do tempo de contacto da amostra com o solvente, da proporção das quantidades da amostra de cabelo e de solvente

Optou-se neste trabalho por usar uma proporção de 25 mL de solvente para 500 mg de amostra, pois esta permite a submersão completa da amostra. As fibras de cabelo cortadas em porções com dimensões reduzidas têm maior área superficial, o que favorece a extração de elementos depositados endogenamente; por outro lado, fibras de cabelo excessivamente compridas dificultam a agitação/homogeneização da mistura cabelo/solvente (bloqueio da barra magnética usada na agitação). Assim, sempre que possível, as fibras de cabelo das amostras sujeitas a lavagem foram cortadas de forma a terem uma extensão entre 2 e 6 cm



Figura 28 – Lavagem das amostras de cabelo (agitação magnética)

Cada porção de 500 mg de cabelo foi colocada num copo de vidro com uma barra magnética e 25 mL de acetona (Figura 28). Ajustou-se a velocidade de agitação de maneira a que esta fosse aproximadamente a mesma nos vários copos. Após os primeiros 10 minutos de

lavagem, a acetona foi decantada, seguindo-se a adição de 25 mL de água ultrapura e sua decantação (3 vezes sucessivas), seguida da adição de 25 mL de acetona e decantação. O tempo de contacto da amostra com o solvente, entre cada decantação, foi de aproximadamente 10 minutos. Procurou-se manter os copos tapados com vidros de relógio ou película plástica durante toda a lavagem, para evitar a possível introdução de poeiras.

### 3.2.4. Secagem das amostras de cabelo

O cabelo é um material higroscópico e a humidade absorvida depende de vários fatores, devendo esta fonte de variabilidade ser eliminada. Por esse motivo, as concentrações dos elementos químicos no cabelo são normalmente expressas por massa seca.

Duas estratégias de secagem foram adotadas neste trabalho para expressar os valores de concentração dos vários elementos químicos por massa seca de cabelo, em função do tipo de amostra de cabelo:

1. Amostras reais – Secagem numa estufa a 70°C, durante pelo menos 12 horas, das porções de cabelo para análise;
2. MRC (ERM DB001 e GBW 09101b) – Divisão das amostras em porções independentes correspondentes a dois grupos: porções para análise e porções para secagem. As porções para a análise foram pesadas e digeridas diretamente, sem qualquer secagem prévia. As porções para secagem foram secas em estufa e a perda de massa correspondente foi usada para determinar a percentagem de humidade ( $H$ ) na amostra (**Equação 1**). Essa percentagem de humidade foi usada como fator de correção das massas usadas para análise.

$$H(\%) = \frac{m_{\text{água}}}{m_{\text{amostra},h}} \times 100 = \frac{m_{\text{amostra},h} - m_{\text{amostra},s}}{m_{\text{amostra},h}} \times 100$$

Equação 1

em que:

$m_{\text{água}}$  (mg) – Massa de água na amostra de cabelo;

$m_{\text{amostra},h}$  (mg) – Massa da amostra de cabelo húmido (i.e. antes da secagem);

$m_{\text{amostra},s}$  (mg) – Massa da amostra de cabelo seco (i.e. após a secagem).

A correção da contribuição da água para a massa das porções de MRC digeridas foi feita usando a seguinte equação:

$$m_{\text{corr}} = m_{\text{pesagem}} - H \times m_{\text{pesagem}}$$

Equação 2

em que:

$m_{\text{corr}}$  (mg) – Massa corrigida da amostra de cabelo pesada;

$m_{\text{pesagem}}$  (mg) – Massa de amostra de cabelo obtida durante a pesagem;

$H$  (%) – Percentagem de humidade

Todas as amostras de cabelo secas foram armazenadas num exsiccador entre a saída da estufa e a respetiva pesagem para análise.

### 3.2.5. Homogeneização das amostras

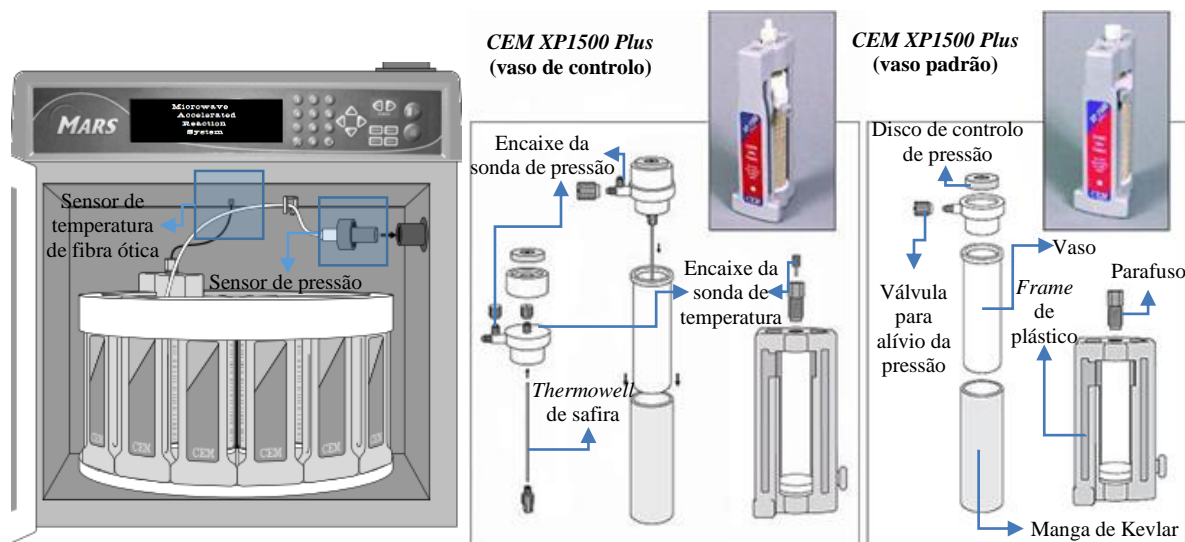
Para que a precisão do sistema analítico seja devidamente avaliada, é necessário que as várias determinações sejam realizadas em alíquotas idênticas de uma mesma amostra, ou seja, é necessário que a amostra seja homogênea. No caso das matrizes sólidas, como é exemplo o cabelo, esta questão adquire especial relevância, pois as amostras sólidas apresentam uma maior tendência para serem heterogêneas (Hoenig 2001, Miller *et al.* 2010). A quantificação de alguns analitos em amostras heterogêneas originará diferenças significativas nas concentrações determinadas em réplicas da mesma amostra, que poderão levar a estimativas erradas (sobrestimadas) da precisão do sistema analítico. Assim, os critérios de validação referentes à precisão poderão não ser cumpridos devido à heterogeneidade da amostra e não às características de desempenho do sistema analítico.

A homogeneização das amostras reais foi realizada num copo de vidro revestido com papel de alumínio (para minimizar a eletricidade estática) e aplicando cortes sucessivos com uma tesoura de aço inoxidável, até obter uma amostra com fragmentos de cabelo inferiores a 0,5 cm. Note-se que, ao ser cortado em pequenos pedaços, a área superficial das amostras aumenta, o que promove um aumento da sua capacidade de absorção de humidade (Byrn 2015). Assim, as amostras de cabelo obtidas após o corte foram colocadas novamente na estufa (a 70°C), durante pelo menos uma hora, para eliminar a humidade que poderá ter sido absorvida pelo cabelo durante a etapa de corte.

Quando as amostras de cabelo analisadas são MRC, o problema da homogeneidade perde relevância, pois a extensão dos fragmentos de cabelo é muito reduzida (o cabelo encontra-se na forma de pó). Durante o processo de certificação do MRC, as entidades certificadoras avaliaram a homogeneidade para a porção de cabelo contida em cada frasco, mas também entre diferentes frascos. Os valores de incerteza calculados para as concentrações certificadas dos vários elementos nos MRC de cabelo são estimados de forma a incluírem a incerteza associada à heterogeneidade da amostra. Contudo, as entidades certificadoras garantem a validade dos valores de incerteza apenas se as recomendações relativamente à utilização do MRC forem devidamente seguidas, nomeadamente as indicações referentes à quantidade mínima de MRC a usar para a digestão e à agitação do recipiente que contém o MRC para uma adequada homogeneização do material que deverá anteceder cada utilização.

### 3.2.6. Digestão do cabelo

As digestões de cabelo realizadas no âmbito deste trabalho tiveram como referência o procedimento indicado numa nota técnica da *CEM Corporation* [15] (secção de Anexos), o fabricante do forno de micro-ondas usado neste trabalho (**Figura 29**).



**Figura 29** – Esquema do forno de micro-ondas usado neste trabalho para a digestão de amostras de cabelo (*CEM Mars 5* modelo 240/50). Vista frontal do forno carregado com um carrossel de vasos *CEM XP1500 Plus* e com as sondas de temperatura (*RTP-300 Plus*) e pressão (*ESP-1500 Plus*) devidamente conectadas ao vaso de controlo [16]; Esquema dos vasos de micro-ondas usados na digestão de cabelos (*CEM XP1500 Plus*) [17,18].

Neste trabalho optou-se por usar os vasos *XP1500 Plus* (**Figura 29**), por serem os recomendados no procedimento de referência considerado. Este tipo de vasos permite a digestão simultânea de um máximo de 12 amostras e um controlo de temperatura rigoroso devido ao uso de uma sonda de temperatura de fibra ótica (Baar 2011).

O procedimento adotado para a digestão de amostras de cabelo em vaso fechado com aquecimento por micro-ondas compreende as seguintes etapas:

1. Pesagem da massa de cabelo (pesagem de 200 mg, numa balança analítica) para a digestão;
2. Adição de 4 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado previamente destilado a cada um dos vasos;
3. Preparação dos vasos para a digestão (fecho, revestimento com manga de Kevlar e colocação no carrossel rotativo);
4. Introdução do carrossel com os vasos no forno de micro-ondas;
5. Conexão das sondas de temperatura e pressão e programação do forno de micro-ondas para definir o programa de aquecimento.
6. Início do programa de aquecimento definido;

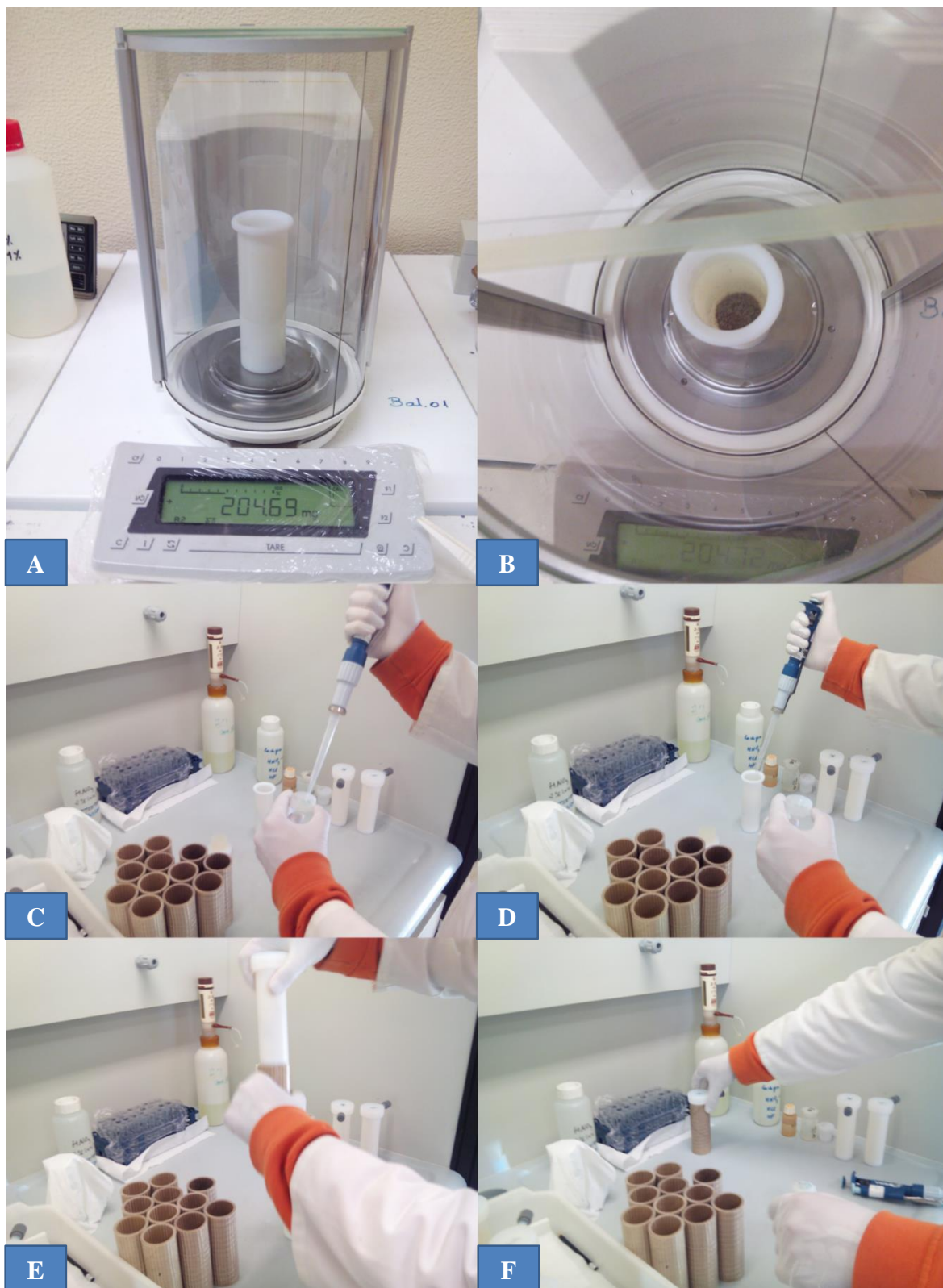
7. Após a conclusão do programa de aquecimento de micro-ondas, transferência do carrossel do interior do forno de micro-ondas para uma *hotte*, para arrefecimento das soluções obtidas até uma temperatura adequada para uma abertura fácil e segura dos vasos;
8. Alívio da pressão das válvulas de segurança para libertação dos vapores acumulados no interior dos recipientes durante a digestão;
9. Recolha e diluição das soluções obtidas com água ultrapura até ao volume pretendido (200 mL) em recipientes devidamente rotulados;
10. Armazenamento das soluções obtidas na ausência de luz e à temperatura ambiente.

A **Figura 30** e a **Figura 31** ilustram a concretização de algumas das etapas da sequência referida.

O programa de aquecimento adotado para a digestão de cabelos consiste num aquecimento progressivo (rampa de temperatura), ao longo de 15 minutos, até aos 180°C, seguido da manutenção desse valor de temperatura durante 15 minutos. A potência aplicada foi ajustada de acordo com o número de vasos envolvidos na digestão, da forma indicada no procedimento de referência, considerando os três valores de potência para os quais é possível programar o forno de micro-ondas usado: 400 W (1-2 vasos), 800 W (3-6 vasos) e 1600 W (mais de 6 vasos).

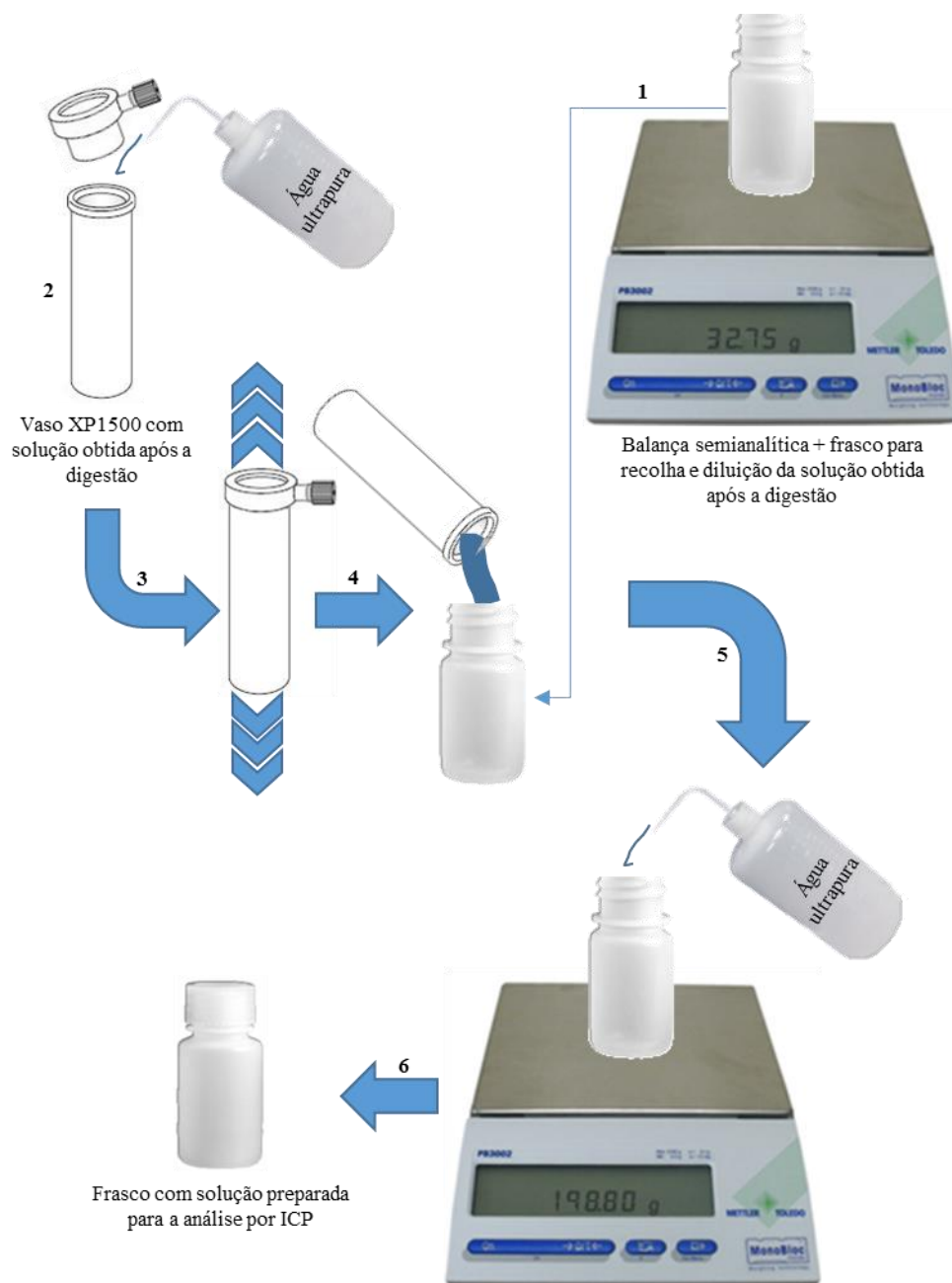
Os procedimentos internos do LCA estipulam que a percentagem de ácido nas soluções que são analisadas nos equipamentos de ICP deverá ser entre 1 e 2% (v/v), pois concentrações superiores podem danificar alguns dos componentes dos equipamentos. Optou-se por usar, nas várias digestões realizadas, uma proporção entre a massa de amostra e o volume de ácido de 50 mg de amostra de cabelo para 1 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. A diluição das soluções obtidas após a digestão (**Figura 31**) foi realizada de maneira a que fosse obtida uma percentagem final de ácido de aproximadamente 2% (v/v).

O volume das soluções obtidas é medido de forma indireta, com base nas respetivas massas. A conversão das massas em volumes é realizada, recorrendo ao respetivo valor de densidade, que depende da percentagem (v/v) final de HNO<sub>3</sub> nessa solução. Para as soluções de HNO<sub>3</sub> a 2% (v/v) esse valor de densidade é  $\approx 1,0082$  g/mL.



**Figura 30 – Preparação de uma amostra de cabelo para a digestão num vaso de micro-ondas CEM XP1500 Plus. A e B:** Determinação da massa de cabelo (MRC) para digestão; **C e D:** Adição de  $\text{HNO}_3$  concentrado; **E e F:** Acondicionamento do vaso de micro-ondas na respetiva manga de Kevlar.





**Figura 31 – Esquema do procedimento de recolha e diluição das soluções obtidas após a digestão.** 1: Determinação da massa do frasco de recolha vazio; 2: Diluição da solução obtida após a digestão; 3: Agitação repetida do vaso de micro-ondas com água ultrapura para lavagem das paredes e da tampa do vaso; 4: Adição da solução de lavagem do vaso de micro-ondas ao recipiente de recolha; 5: Diluição da solução obtida até ao volume pretendido; 6: Armazenamento das soluções obtidas (na ausência de luz e à temperatura ambiente).

### 3.2.7. Análise das soluções por ICP-MS

A operação do equipamento de ICP-MS (**Figura 32**) é um processo complexo que exige um técnico qualificado. De forma global, a operação do equipamento de ICP-MS existente no LCA pode ser dividida em quatro etapas principais (descritas de forma detalhada nas próximas subsecções deste documento):

1. Início do funcionamento do equipamento de ICP-MS e dos respetivos periféricos;

2. Otimização do sinal instrumental;
3. Obtenção das funções de calibração;
4. Quantificação das amostras a analisar.

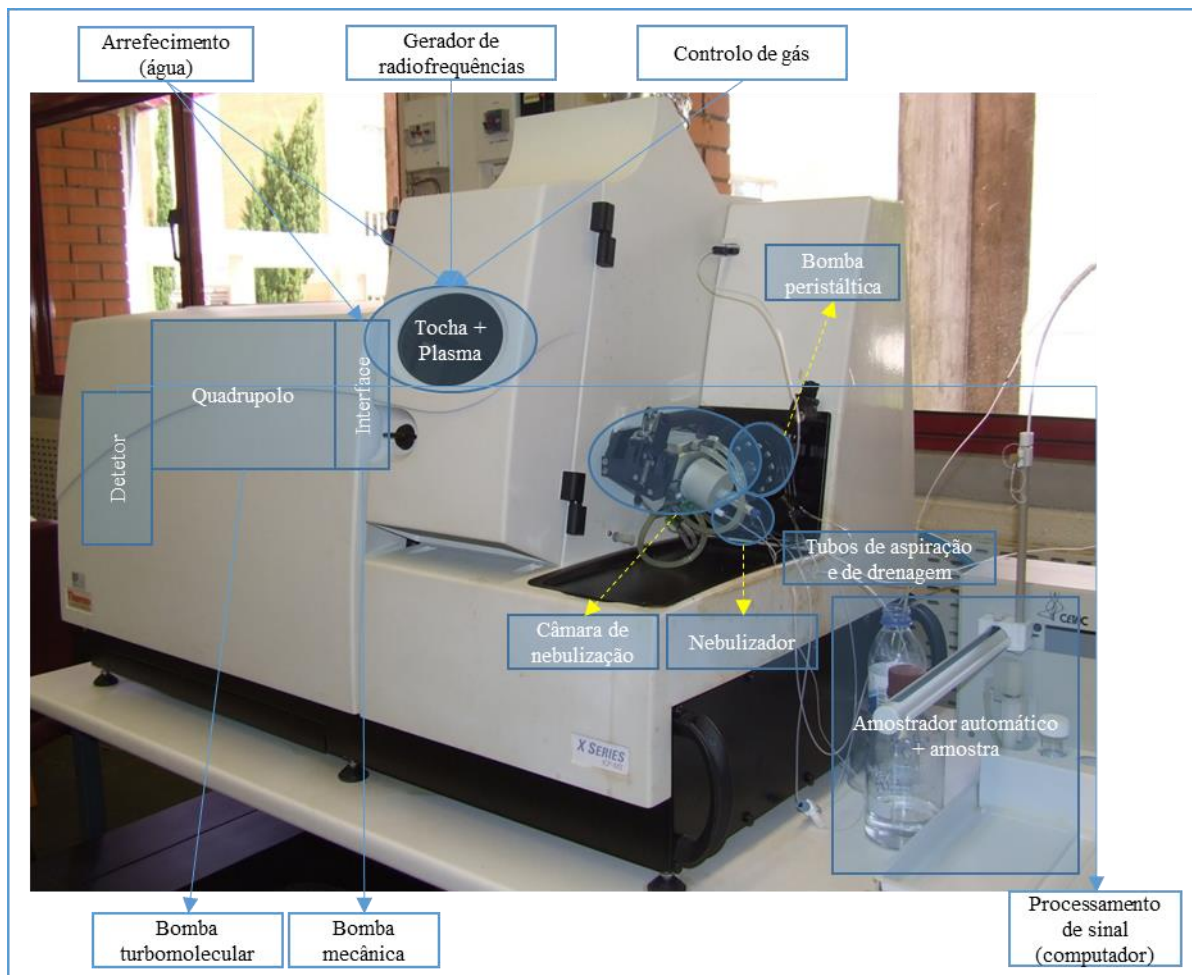


Figura 32 – Equipamento de ICP-MS existente no LCA (com indicação dos principais componentes)

- **Otimização das condições de operação do equipamento**

Como se verifica no fluxograma apresentado na **Figura 33**, são realizados vários testes preliminares de desempenho do equipamento de ICP-MS, o que permite identificar e evitar a ocorrência de vários tipos de problemas. Na etapa de *autotune*, o instrumento realiza uma otimização do sinal, de forma a maximizar o sinal correspondente ao isótopo  $^{115}\text{In}$  (um dos isótopos que pode ser usado como padrão interno) e a minimizar a formação de óxidos e de espécies de múltipla carga que possam gerar interferências isobáricas. Para a minimização dos óxidos, é considerado o rácio de sinais  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ , enquanto para o controlo das duplas cargas é considerado o rácio  $^{69}\text{Ga}/^{138}\text{Ba}$ . O cério é o elemento considerado para a avaliação da formação de óxidos porque tem uma afinidade



particularmente grande para a combinação com o oxigénio, formando um óxido de difícil dissociação (entalpia de ligação de 759 kJ/mol) mesmo nas condições altamente energéticas do plasma (Scientific 2008).

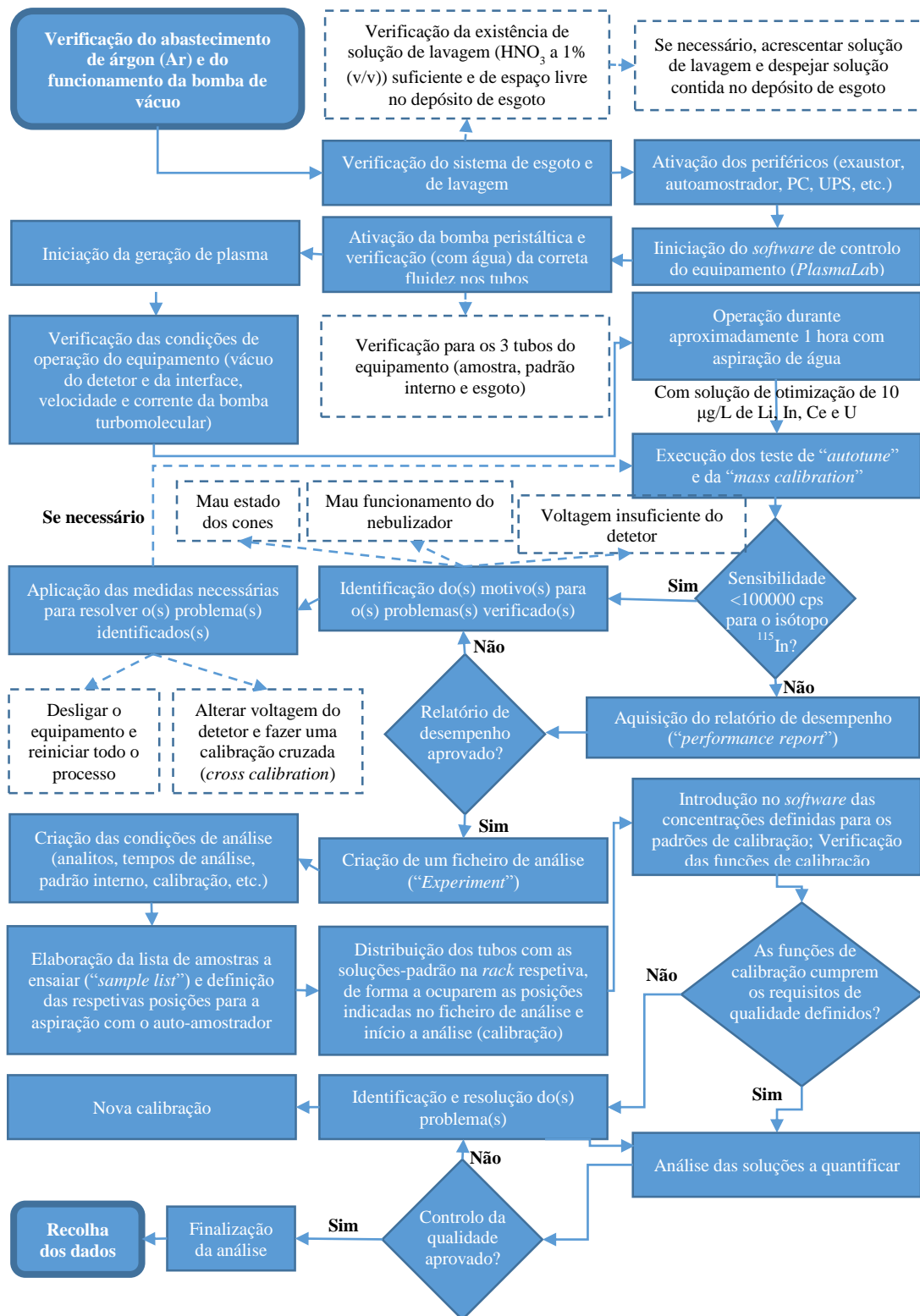


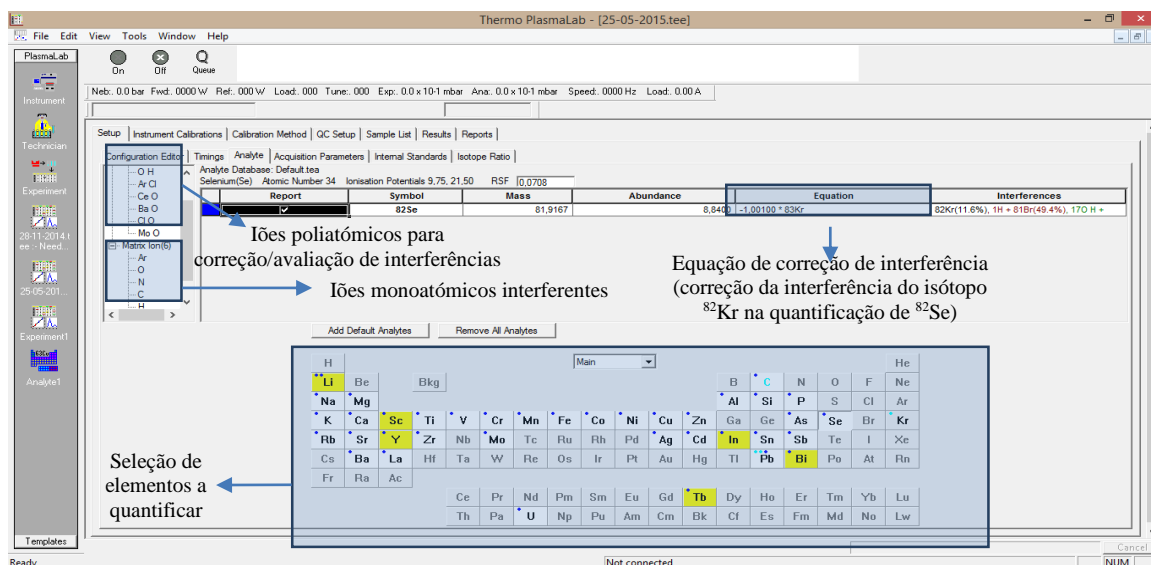
Figura 33 – Fluxograma das etapas associadas à operação do equipamento de ICP-MS existente no LCA

Quando no final do *autotune* se verifica que o sinal obtido para o  $^{115}\text{In}$  (sensibilidade) é inferior a 100000 contagens por segundo (cps) (aspiração de solução com 10  $\mu\text{g/L}$  de  $^{115}\text{In}$ ), procura-se identificar-se as causas desse problema. Essas causas podem ser, por exemplo, sujidade nos cones ou fim de vida destes, mau funcionamento do nebulizador ou voltagem insuficiente do detetor. Caso se verifiquem alterações nas condições do detetor, procede-se, com uma solução de otimização com 200  $\mu\text{g/L}$  de  $^{115}\text{In}$ , à calibração cruzada, sendo que o fator (médio) calculado pelo *software* do equipamento (*PlasmaLab*) nessa etapa deverá estar compreendido entre 70000 e 110000 cps.

Após o ajuste das condições instrumentais é realizado um teste de desempenho para verificar que as condições de aquisição do sinal estão devidamente otimizadas, o que corresponde à verificação e ao cumprimento das seguintes condições: o sinal obtido para o  $^{115}\text{In}$  é superior a 100000 cps, este sinal não varia mais do que 2%, o ruído de fundo ( $^{220}\text{Bkg} < 10$  cps) não é significativo, assim como a formação de óxidos ( $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce} < 2\%$ ) e de espécies de carga dupla ( $^{69}\text{Ga}/^{138}\text{Ba} < 3\%$ ). Se este teste falhar relativamente aos critérios de desempenho definidos, identificam-se as causas do problema e procede-se à sua resolução. Algumas das ações a tomar nesta situação são a estabilização do equipamento durante um maior período de tempo ou a sua reinicialização.

- **Seleção dos isótopos a quantificar e do modo de quantificação**

Após verificar que o equipamento se encontra a funcionar nas devidas condições, a análise das amostras que se pretendem estudar pode ser iniciada. O primeiro passo dessa análise é a seleção dos isótopos que se pretende quantificar na tabela periódica do menu de seleção dos analitos no *PlasmaLab* (**Figura 34**). É também nesse menu que são selecionados os iões poliatômicos e monoatômicos que serão quantificados para avaliar/corrigir possíveis interferências e são definidas as equações matemáticas a usar na sua correção.



**Figura 34** – Menu do *PlasmaLab* para a seleção dos isótopos e interferências a quantificar durante a análise por ICP-MS. Os elementos assinalados com um fundo amarelo correspondem aos usados como padrão interno, enquanto os elementos com um fundo branco correspondem aos que poderão ser quantificados no cabelo. Os pontos a azul acima de cada um dos elementos representam o número de isótopos quantificados para cada um desses elementos. Os pontos a azul claro (Pb e Kr) correspondem a isótopos que estão envolvidos nas equações matemáticas usadas para correção de sinal. Por fim, os elementos com o respetivo símbolo químico a azul claro (C) correspondem aos interferentes de matriz (Ar, O, N, C, H e OH).

Os isótopos selecionados podem ser quantificados com dois modos de calibração: “*fully quantitative*” ou “*semi-quantitative*”. O modo de quantificação do tipo “*fully quantitative*” corresponde ao método de calibração típico, i.e. à obtenção de funções de calibração por análise de soluções-padrão. Esse foi o modo usado na quantificação da maioria dos elementos. O modo de quantificação semiquantitativo (“*semi-quantitative*”) envolve o cálculo da sensibilidade instrumental para cada um dos isótopos, a partir de uma curva de calibração, definida por representação gráfica dos declives das funções de calibração obtidas para os vários isótopos quantificados em modo “*fully quantitative*”, em função da razão massa-carga (i.e. em função do isótopo). A sensibilidade instrumental calculada desse modo é usada para converter o sinal medido em concentração. Este modo de quantificação foi usado na análise de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e enxofre ( $^{33}\text{S}$ ), para comparar a concentração desses elementos nas diferentes soluções de cabelo digerido.

- **Definição dos parâmetros de aquisição do sinal**

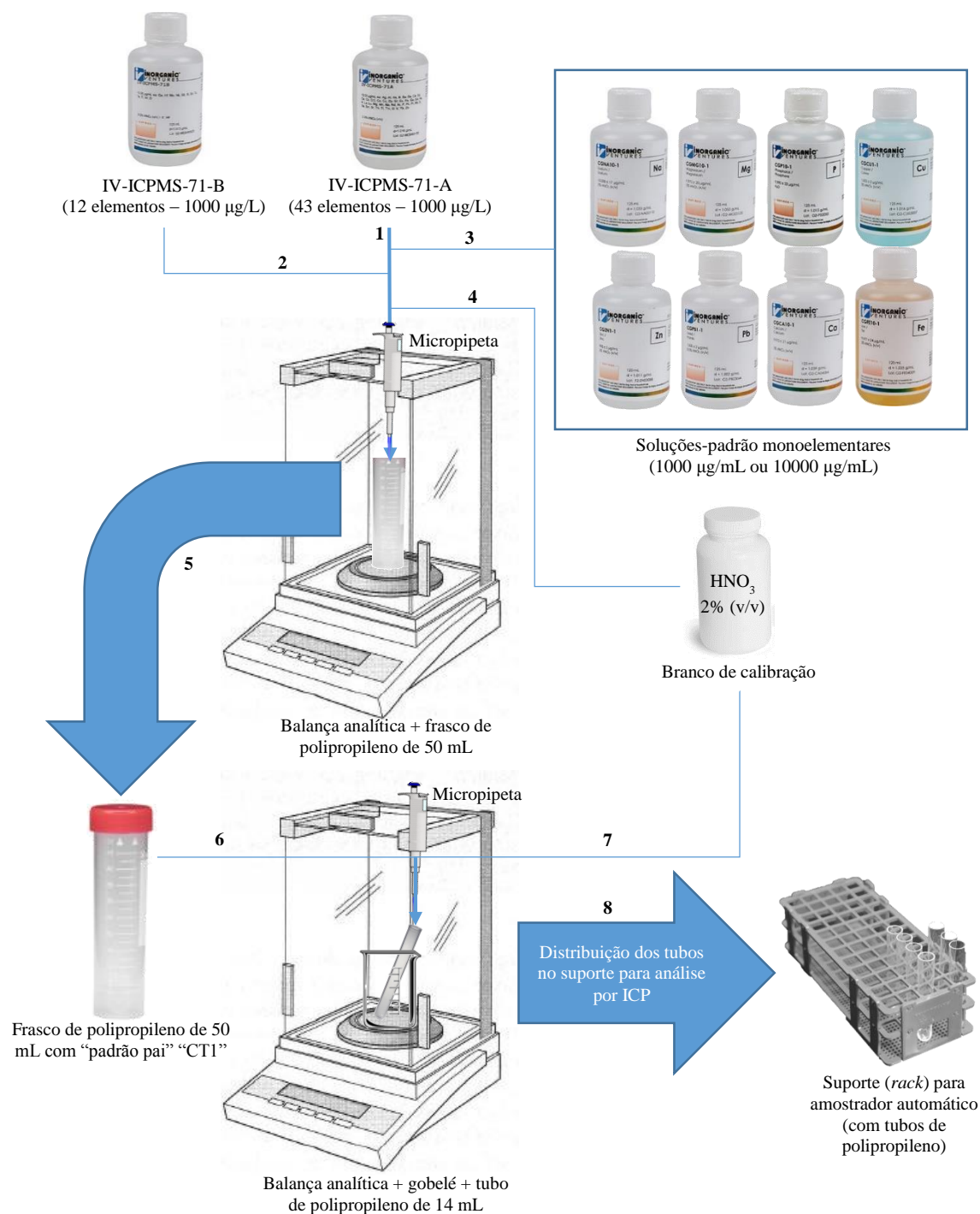
Após a seleção dos isótopos a quantificar, procedeu-se à seleção das condições de aquisição do sinal. Essas condições são o número de canais (*channels*), varrimentos (*sweeps*) e tempo de aquisição (*dwell time*). Na **Tabela 6** são apresentados os valores de referência que foram considerados nas várias quantificações por ICP-MS realizadas no contexto deste Estágio.

Tabela 6 – Valores de referência para os parâmetros de aquisição do sinal analítico no modo “*peak jump*” (Coimbra 2007)

Parâmetros de aquisição do sinal	Valores de referência
Canais ( <i>Channels</i> )	1
Varrimentos ( <i>Sweeps</i> )	60
Tempo de aquisição ( <i>Dwell time</i> )	10 ms

- **Calibração do equipamento de ICP-MS**

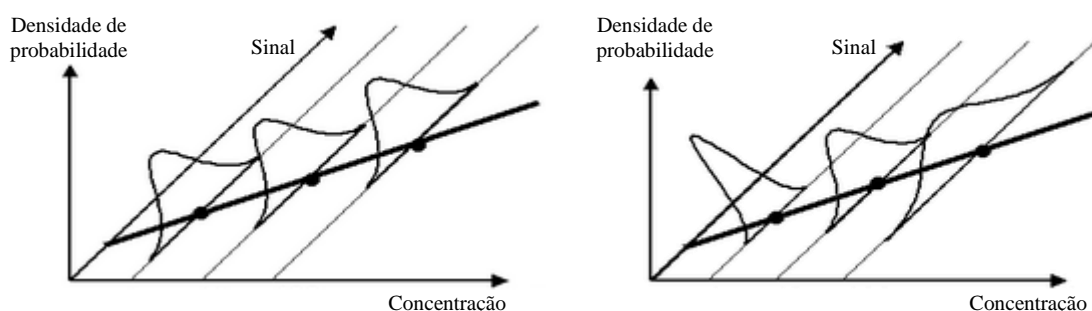
Os padrões de calibração foram preparados de acordo com o procedimento indicado na **Figura 35**. Começou-se por proceder à preparação do “padrão pai” “CT1”, que foi obtido por diluição de alíquotas dos padrões comerciais multielementares IV-ICPMS-71A e IV-ICPMS-71B com o branco de calibração, às quais foram adicionadas alíquotas de padrões comerciais monoelementares, para ajustar a concentração dos vários elementos, de forma a que estas correspondessem às proporções típicas das concentrações dos vários elementos no cabelo. O branco de calibração foi preparado por diluição de 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e destilado em água ultrapura, num volume final de 500 mL, para que a percentagem de ácido nos padrões de calibração fosse idêntica à obtida nas soluções de cabelo digerido ( $\approx 2\%$  (v/v)). Os padrões de calibração foram preparados por diluição do “padrão pai” “CT1”, de forma a abrangerem uma gama de concentrações correspondente às concentrações expectáveis nas soluções de cabelo digerido. O branco de calibração foi também analisado e incluído no conjunto de soluções usadas na obtenção das funções de calibração, seguindo as recomendações do guia da RELACRE referente à validação de métodos internos de ensaio em análise química (Guia 13) (RELACRE 2000).



**Figura 35 – Procedimento global de preparação das soluções padrão para a obtenção das funções de calibração a usar na quantificação por ICP-MS. 1, 2 e 3:** Medição das massas correspondentes aos volumes pretendidos dos padrões multielementares IV-ICPMS-71-A e IV-ICPMS-71B e dos padrões monoelementares. **4:** Diluição da mistura obtida com branco de calibração até ao volume pretendido ( $\approx 50$  mL); **5:** Obtenção do padrão intermédio a partir do qual, por diluição, é feita a preparação dos padrões de calibração. **6 e 7:** Preparação dos padrões de calibração, por medição direta nos tubos do amostrador automático da massa correspondente aos volumes pretendidos do “padrão pai” “CT1” e diluição com branco de calibração para o volume pretendido ( $\approx 10$  mL); **8:** Distribuição dos tubos nas posições pretendidas do suporte (rack) do amostrador automático. Após a preparação de cada padrão, o tubo correspondente é tapado com uma rola de plástico ou *parafilm* para evitar a introdução de poeiras nas soluções preparadas.

Os cálculos necessários para a obtenção das funções de calibração são realizados pelo *PlasmaLab*, ao longo da análise das soluções que se destinam a esse propósito (padrões de calibração). No LCA a calibração do equipamento de ICP é realizada recorrendo ao modelo

linear pesado. Esse modelo é usado para tirar proveito da ampla gama de linearidade que é característica dos equipamentos de ICP. Por serem usadas gamas de trabalho alargadas, um dos pressupostos associados ao modelo não-pesado dos mínimos quadrados não é cumprido; esse pressuposto é a homogeneidade de variâncias (**Figura 36 – A**), i.e. a inexistência de variação significativa da dispersão do sinal analítico ao longo da gama de concentração de analito considerada. Quando essa variação é significativa, diz-se que existe heterocedasticidade (**Figura 36 – B**).



**Figura 36 – Dispersão das medições de sinal analítico ao longo de uma determinada gama de concentrações. A: Homogeneidade de variâncias; B: Heterocedasticidade [19]**

As fórmulas de cálculo associadas ao modelo pesado dos mínimos desvios quadrados são análogas às obtidas com o modelo linear não-pesado, mas no modelo pesado é introduzido mais um fator (o “peso”) que reflete a variância associada às réplicas de medição do sinal analítico na análise de cada padrão. Esse peso é estimado a partir da variância associada a várias réplicas de leitura do sinal analítico, em condições de repetibilidade, correspondente a cada um dos padrões usados. É possível configurar o equipamento de ICP-MS, de forma a definir quantas réplicas de medição de sinal serão realizadas durante a aspiração de cada uma das soluções analisadas. O inverso da variância associada às réplicas de leitura do sinal dos padrões de calibração constitui o peso que cada um desses padrões terá na obtenção da função de calibração. Neste trabalho, a análise das várias soluções foi realizada com três réplicas de leitura do sinal analítico. Este é o número de réplicas de leitura definido normalmente no LCA e constitui um compromisso entre uma estimativa razoável do desvio-padrão e o incremento no tempo total de análise que a realização de réplicas implica. De notar que, de acordo com Committee (1994), mesmo estimativas do desvio-padrão obtidas com um número reduzido de réplicas melhoram significativamente a validade deste tipo de modelo pesado de calibração. Na **Tabela 7** são apresentados os símbolos e as descrições das variáveis que são usadas nas várias equações associadas ao modelo linear pesado (**Tabela 8**).

Tabela 7 – Variáveis que fundamentam os cálculos estatísticos associados ao modelo linear de calibração pesada (ver Tabela 8)

Símbolo	Descrição
$k_i$	Número de réplicas de leitura do sinal analítico associado ao padrão $i$
$n$	Número de padrões/pontos usados na obtenção da função de calibração
$x_i$	Concentração (conhecida) associada ao padrão $i$
$y_{ij}$	Sinal analítico obtido experimentalmente na réplica de leitura $j$ do padrão $i$
$\hat{Y}$	Sinal calculado para uma solução de concentração $X$ recorrendo à função de calibração
$X$	Concentração (desconhecida) calculada através da função de calibração
$Y$	Sinal analítico obtido na análise da solução com concentração (desconhecida) $X$
$W$	Peso correspondente à leitura do sinal $Y$ numa solução com concentração (desconhecida) $X$

Os resultados obtidos durante a análise das várias soluções aspiradas pelo equipamento de ICP-MS são apresentados no menu “Results” (Figura 37). Este relatório apresenta várias tabelas com os resultados obtidos, nomeadamente do sinal sem qualquer tratamento (“Mass uncorrected ICPS”) e aplicando a correção do padrão interno e ordenada na origem (“Analyte ICPS”) e a conversão de sinal em concentração, através da função de calibração (“Analyte Dilution Conc.”). Os dados referentes às concentrações foram extraídos para o software Microsoft Excel, recorrendo a uma “Macro” previamente contruída no LCA, para proceder a todo o tratamento de dados subsequente.

The screenshot shows the Thermo PlasmaLab software interface. The main window displays a table of analytical results for various elements (Li, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe) across different runs. The table includes columns for Run, Time, and various elemental concentrations in ppb. The results are color-coded: blue for typical calibration, purple for semi-quantified, and yellow for fully quantified. The interface also shows a sidebar with navigation options and a status bar at the bottom indicating 'Not connected'.

Figura 37 – Menu “Results” do PlasmaLab, onde é apresentado o relatório dos resultados obtidos na quantificação de vários elementos. Os isótopos assinados a azul e a roxo correspondem, respetivamente, aos quantificados com o método de calibração típico (“fully quantified”) e aos quantificados com o modo semiquantitativo (“semi-quantified”). Os valores assinalados com fundo amarelo correspondem aos resultados obtidos na análise dos isótopos que podem ser usados como padrão interno.

Tabela 8 – Equações usadas no cálculo da função de calibração com o modelo pesado dos mínimos desvios quadrados (Asuero *et al.* 2006, Miller *et al.* 2010)

Designação/Símbolo		Equação matemática/Descrição	Legenda
Número total de leituras de sinal para a obtenção da função de calibração ( $n$ )		$n = \sum_i k_i$	Equação 3
Leitura do sinal analítico do padrão $i$	Média ( $y_i$ )	$y_i = \frac{\sum_j y_{ij}}{k_i}$	Equação 4
	Desvio-padrão ( $s_i$ )	$s_i = \frac{\sum_j (y_{ij} - y_i)}{k_i - 1}$	Equação 5
	Peso ( $w_i$ )	$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2} / n}$	Equação 6
Valores médios globais (todos os padrões)	Concentrações	$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$	Equação 7
	Concentrações pesadas ( $\bar{x}_w$ )	$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n}$	Equação 8
	Sinais	$\bar{y} = \frac{\sum_i y_i}{n}$	Equação 9
	Sinais pesados ( $\bar{y}_w$ )	$\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{n}$	Equação 10
Somadas de quadrados pesados ( $S_w$ )	Desvios das concentrações ao valor médio ( $S_{wxx}$ )	$S_{wxx} = \sum_i w_i (x_i - \bar{x})^2$ $S_{wxx} = \sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2$	Equação 11
	Desvios dos sinais analíticos ao valor médio ( $S_{wyy}$ )	$S_{wyy} = \sum_i w_i (y_i - \bar{y})^2$ $S_{wyy} = \sum_i w_i y_i^2 - n \bar{y}_w^2$	Equação 12
	Produtos cruzados dos desvios das concentrações e dos sinais aos respectivos valores médios ( $S_{wxy}$ )	$S_{wxy} = \sum_i w_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$ $S_{wxy} = \sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w$	Equação 13
Calibração linear pesada	Modelo matemático	$\hat{y} = m_w x + b_w$	Equação 14
	Declive ( $m_w$ )	$m_w = \frac{S_{wxy}}{S_{wxx}}$	Equação 15
	Ordenada na origem ( $b_w$ )	$b_w = \bar{y}_w - m_w \bar{x}_w$	Equação 16
Coeficiente de correlação (linear) de Pearson ( $r$ )		$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$	Equação 17
Resíduos	Soma dos quadrados dos desvios verticais do modelo linear ( $S_{wy}$ )	$d_{ij} = \sqrt{w_i} (y_{ij} - (m_w x_i + b_w))$ $d_{ij} = \sqrt{w_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)$	Equação 18
	Desvios verticais do modelo linear pesado ( $d_i$ )	$S_{wy} = \sum_i \sum_j d_{ij}^2$ $S_{wy} = S_{wyy} - m_w^2 S_{wxx}$	Equação 19
Incertezas-padrão ( $s$ )	Resíduos ( $S_{wy}$ )	$S_{wy} = \sqrt{\frac{S_{wy}}{n - 2}}$	Equação 20
	$m_w$ ( $S_{wm}$ )	$S_{wm} = \frac{S_{wy}}{\sqrt{S_{wxx}}}$	Equação 21
	$b_w$ ( $S_{wb}$ )	$S_{wb} = S_{wy} \sqrt{\frac{\sum_i (w_i x_i^2)}{n \times S_{wxx}}}$	Equação 22
	Concentração calculada ( $s_{wX}$ )	$s_{wX} = \frac{S_{wy}}{m_w} \sqrt{\frac{1}{W} + \frac{1}{n} + \frac{(Y - \bar{y}_w)^2}{m_w^2 \times S_{wxx}}}$	Equação 23



- **Conversão do sinal instrumental em concentração**

A conversão dos sinais instrumentais obtidos por ICP-MS em valores de concentração dos analitos por massa seca de cabelo envolve várias etapas: (1) correção dos sinais medidos com a recuperação de padrão interno, (2) correção de interferências isobáricas e (3) conversão dos sinais medidos em valores de concentração nas soluções (com a função de calibração), (4) conversão das concentrações obtidas para as soluções de cabelo digerido ( $\mu\text{g/L}$ ) em concentrações de massa seca ( $\mu\text{g/g}$ ).

Como referido na secção introdutória deste documento, a técnica de ICP-MS requer frequentemente que seja usado um padrão interno para compensar efeitos de matriz e alterações nas condições de operação do equipamento durante a análise. Neste contexto, o equipamento de ICP-MS do LCA opera com a aspiração contínua (“*online*”) de uma solução de padrão interno com  $\approx 50 \mu\text{g/L}$  de  $^6\text{Li}$ ,  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{156}\text{Tb}$  e  $^{209}\text{Bi}$ , a qual é sujeita a uma diluição de  $\approx 5$  vezes ao ser misturada com as soluções analisadas. O sinal analítico obtido para o padrão interno na análise do primeiro padrão de calibração aspirado (o branco de calibração) é definido como 100%, constituindo o valor de referência relativamente ao qual serão corrigidos os valores de sinal analítico obtido para as várias soluções analisadas. A correção referida corresponde ao quociente entre os valores de sinal analítico obtidos para os vários isótopos quantificados e um fator de correção, que é a recuperação do padrão interno ( $R_{PI}$ ), calculada (em percentagem) de acordo com a seguinte equação:

$$R_{PI}(\%) = \frac{S_{PI,n}}{S_{PI,1}} \times 100$$

Equação 24

em que:

$S_{PI,1}$  (cps) – Sinal analítico referente ao padrão interno obtido na leitura da solução de referência (branco de calibração);

$S_{PI,n}$  (cps) – Sinal analítico referente ao padrão interno na leitura da  $n$ ésima solução analisada após a solução de referência.

Aos valores de sinal analítico obtidos para o analito após a correção com o padrão interno é ainda subtraído o valor da ordenada na origem da função de calibração.

Na **Tabela 9** são apresentados alguns exemplos numéricos das correções referidas com a recuperação do padrão interno e com a ordenada na origem da função de calibração.

Tabela 9 – Exemplos de correção do sinal do analito com os valores de recuperação do padrão interno ( $R_{PI}$ ) e da ordenada na origem da função de calibração ( $b_0$ )

Ordem de análise	Correção com o valor de recuperação do padrão interno				Correção com o valor da ordenada na origem	
	Sinais “brutos” (cps)		$R_{PI}$ (%)	Sinais corrigidos para o analito (cps)	Ordenada na origem da função de calibração	Sinais corrigidos para o analito (cps)
	Padrão interno	Analito				
1 (solução de referência)	80000	1000	100	1000	100	900
2	76000	665	95	700		600
3	72000	360	90	400		300
4	68000	1020	85	1200		1100
...						
N	88000	1980	110	1800		1700

Os isótopos usados como padrão interno nas várias análises por ICP-MS realizadas no contexto deste Estágio foram:  $^{45}\text{Sc}$  (correção nas massas menores),  $^{115}\text{In}$  (correção nas massas intermédias) e  $^{159}\text{Tb}$  (correção nas massas superiores.). Posteriormente (capítulo 4), descreve-se detalhadamente como foi realizada a definição dos padrões internos para a quantificação dos vários elementos por ICP-MS.

Os sinais medidos com a técnica de ICP-MS podem ser afetados por interferências espectrais, designadas por isobáricas, que se devem à presença de espécies iónicas distintas, mas com uma diferença no valor de massa-carga inferiores a uma unidade de massa atómica (1 amu). Ou seja, as massas dessas espécies iónicas são tão próximas que o analisador de iões (quadrupolo) não as consegue distinguir, devido à sua resolução insuficiente. Por esse motivo, para alguns elementos, pode ser necessário corrigir o sinal analítico obtido relativamente à possível contribuição de espécies interferentes. Esse tipo de correção corresponde à subtração do sinal correspondente à espécie química interferente e é feita de forma automática pelo *software* do equipamento, com uma equação matemática introduzida no *PlasmaLab*. Para definir a equação matemática de correção a usar, é necessário realizar um estudo prévio de avaliação de interferências.

A título de exemplo, é apresentada a equação matemática usada na correção da interferência do ião poliatómico  $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$  na quantificação de  $^{60}\text{Ni}^+$ :

$$S(^{60}\text{Ni}) = S(m/z = 60) - f \times S(^{44}\text{Ca})$$

Equação 25

onde:

$S(^{60}\text{Ni})$  (cps) – Sinal corrigido para o isótopo de níquel considerado;

$S(m/z=60)$  (cps) – Sinal total obtido para o valor de  $m/z=60$ ;

$f$  – Fator de interferência;

$S(^{44}\text{Ca})$  (cps) – Sinal obtido para o isótopo da espécie que origina a interferência (cálcio).

No caso de interferências que não envolvam a combinação de diferentes elementos, por exemplo a interferência do isótopo  $^{115}\text{Sn}$  na quantificação de  $^{115}\text{In}$ ,  $f$  pode ser diretamente calculado a partir das abundâncias naturais dos isótopos envolvidos na correção do sinal. Neste caso em particular, a correção do sinal do  $^{115}\text{In}$  envolve a quantificação do  $^{118}\text{Sn}$ . Como as abundâncias naturais do  $^{115}\text{Sn}$  e  $^{118}\text{Sn}$  são, respetivamente, 0,34% e 24%, a equação matemática aplicada para corrigir o sinal do  $^{115}\text{In}$  é:

$$S(^{115}\text{In}) = S(m/z = 115) - \frac{0,34}{24} \times S(^{118}\text{Sn})$$

Equação 26

onde:

$S(^{115}\text{In})$  (cps) – Sinal corrigido para o isótopo de níquel considerado;

$S(^{118}\text{Sn})$  (cps) – Sinal corrigido para o isótopo de estanho considerado;

$S(m/z=115)$  (cps) – Sinal total obtido para o valor de  $m/z=115$ .

Após as várias correções ao sinal analítico referidas nos parágrafos precedentes, este é convertido automaticamente pelo *software* num valor de concentração para a solução analisada, com base na função de calibração, através da seguinte fórmula matemática:

$$C_{inst} = \frac{S_{corr}}{m_{cal}}$$

Equação 27

em que:

$C_{inst}$  (µg/L) – Valor calculado pelo equipamento para a concentração de analito na solução analisada;

$S_{corr}$  (cps) – Sinal corrigido;

$m_{cal}$  (cps·L/µg) – Declive da função de calibração.

As concentrações apresentadas no *PlasmaLab* para as várias soluções são convertidas em concentração no cabelo recorrendo à seguinte equação:

$$C_f = \frac{C_{inst} \times V_{sol}}{m_{cabelo}}$$

Equação 28

em que:

$C_f$  (µg/g) – Concentração (final) de analito na amostra de cabelo;

$C_{inst}$  ( $\mu\text{g/L}$ ) – Valor calculado pelo equipamento para a concentração de analito na solução obtida após digestão da amostra de cabelo e diluição com água ultrapura;

$V_{sol}$  (L) – Volume da solução obtida após digestão e diluição com água ultrapura;

$m_{cabelo}$  (g) – Massa de cabelo seco.

Antes de se poder usar um determinado conjunto de resultados na validação de um sistema analítico, é necessário garantir que esses resultados cumprem determinados requisitos de qualidade. Neste contexto, deve ser evitada a abordagem ambígua que é adotada por alguns laboratórios, e que consiste simplesmente em declarar que a qualidade dos resultados obtidos é a melhor possível. Essa abordagem não permite garantir que a qualidade dos resultados seja adequada ao uso que lhes é feito ou exigido (RELACRE 1996).

O laboratório deverá definir critérios claros de aceitação/rejeição de resultados, expressos preferencialmente de forma numérica, de modo a que se conheça e garanta o cumprimento dos requisitos de qualidade. Esses critérios deverão estar definidos não só para os resultados finais, i.e. os resultados obtidos após a execução de todo o procedimento analítico, mas também para os resultados obtidos em cada uma das respetivas etapas, através da definição de subcritérios que permitam controlar e gerir a qualidade do resultado que está a ser produzido. Esses critérios deverão ser ainda acompanhados das medidas a tomar no caso de rejeição, i.e. das ações corretivas (RELACRE 1996).

Para as matrizes no âmbito da acreditação do LCA (águas e solos), e para a técnica de ICP-MS, as medidas de controlo e garantia da qualidade adotadas no LCA estão indicadas em vários procedimentos internos. Embora esses procedimentos correspondam a matrizes diferentes da matriz em estudo neste trabalho, a maioria dos princípios e critérios de controlo e garantia da qualidade indicados são comuns a vários tipos de análise. Assim, esses documentos foram tomados como referência no planeamento do trabalho apresentado neste documento, e foi nestes que se basearam os procedimentos e critérios gerais de garantia e controlo da qualidade dos resultados gerados neste trabalho.

### **3.2.8. Controlo e validação dos resultados obtidos por ICP-MS**

Embora a qualidade dos resultados obtidos na análise química de cabelo dependa principalmente da amostragem e da preparação da amostra, depende também do correto funcionamento do equipamento de ICP-MS na quantificação. Todo o trabalho que antecede a análise por ICP-MS será comprometido se a quantificação não for devidamente executada.

Para verificar o correto funcionamento do equipamento de ICP-MS, é necessário recorrer a um conjunto de soluções, que são indicadas na **Tabela 10** (em conjunto com os respetivos procedimentos de preparação e funções).

**Tabela 10 – Soluções envolvidas na operação do equipamento de ICP-MS**

Soluções	Preparação/Descrição	Função
<b>TUNE A</b>	Solução comercial contendo In, Ce, Ba, Be, Bi, Co, Li, Pb, U, com uma concentração de 10 mg/L para cada elemento.	Preparação das soluções de otimização do equipamento
<b>Soluções de otimização</b>	Preparação de duas soluções, com uma concentração de In de aproximadamente 10 µg/L e 200 µg/L, respetivamente, a partir da solução <i>TUNE A</i> -	Otimização do sinal do equipamento na etapa de <i>autotune</i>
<b>Solução de padrão interno</b>	Diluição de padrões comerciais monoelementares de Sc, In e Tb com concentração final $\approx 50$ µg/L para cada elemento.	Correção de efeitos de matriz e de variação das condições do equipamento
<b>Solução de lavagem</b>	Solução aquosa de HNO <sub>3</sub> p.a. a 1% (v/v)	Lavagem dos componentes instrumentais entre a aspiração de cada uma das soluções a analisar
<b>Padrões de calibração</b>	Preparação de acordo com o procedimento descrito anteriormente	Cálculo das funções de calibração (pesadas) usadas para a quantificação.
<b>Branco de calibração</b>	Soluções preparadas da mesma forma que os padrões de calibração, mas sem conter o analito	Avaliação de contaminações aleatórias durante a quantificação e de efeitos de memória no equipamento, por comparação com o limite de deteção (LD)
<b>PVFC</b>	Padrão de verificação da função de calibração – Solução de concentração conhecida, mas de origem independente da usada na preparação dos padrões de calibração	Verificação da exatidão da quantificação
<b>PVLQ</b>	Padrão de verificação do limite de quantificação (LQ) – Solução com concentração correspondente ao LQ	Verificação da capacidade do equipamento para quantificar devidamente no mínimo da gama de trabalho
<b>Padrão de verificação de interferente(s)</b>	Solução aquosa com concentração conhecida de uma (ou várias) espécie(s) química(s) interferente(s)	Verificação de interferências e cálculo de fatores de correção
<b>Branco de digestão</b>	Porção de ácido usada na digestão de amostras, que é sujeita a todo o processo de digestão, mas sem estar em contacto com a amostra. Essa porção é diluída para o mesmo volume das soluções das amostras digeridas	Verificação do sinal mínimo correspondente às amostras digeridas e da possível introdução de contaminações durante a digestão

As técnicas de ICP são suscetíveis à ocorrência de “*drift*”. Esse fenómeno é explicado pela variação das condições de quantificação do equipamento, que se refletem numa variação significativa da concentração calculada para uma solução analisada repetidamente, ao longo do período em que decorre o ensaio analítico. Essa variação ocorre de forma sistemática, i.e. o sinal analítico aumenta ou diminui sucessivamente.

Existem várias causas que podem originar uma variação das condições de quantificação do equipamento ao longo do tempo. Essas causas incluem: deposição de poeiras, perda dos elementos dissolvidos (por volatilização ou precipitação) lixiviação de elementos adsorvidos às paredes dos recipientes que contêm as soluções, mudança da temperatura da sala onde se encontra o equipamento, deposição de material nos cones de amostragem (reduzindo o tamanho dos orifícios e, conseqüentemente, o fluxo de íons que entra no quadrupolo), variações na eficiência da aspiração e da nebulização, etc. Apesar de serem tomadas medidas para evitar a ocorrência deste tipo de fenômenos, que incluem a manutenção do equipamento e o uso de um padrão interno, com o objetivo de compensar eventuais efeitos de matriz e variações das condições do equipamento, não é recomendável assumir que as condições instrumentais se mantêm estáveis ao longo de toda a análise.

Como as condições do equipamento podem variar significativamente ao longo do tempo em que decorre a quantificação, é necessário que o controle da qualidade inclua todo o período de operação do equipamento. Assim, em ICP-MS, a quantificação é normalmente realizada por blocos, em que os vários blocos de análise (10 a 20 soluções) são intercalados por blocos de verificação com soluções de controle, de forma a validar os resultados referentes às soluções que antecederam.

- **Análise de soluções de controle**

A verificação da exatidão dos resultados obtidos na quantificação por ICP-MS implica garantir que as funções de calibração são adequadas, minimizando o erro de justeza e que as condições de aquisição do sinal se mantêm estáveis ao longo do tempo, maximizando a precisão. A avaliação destes fatores envolve a análise de soluções com concentrações de referência (conhecidas) após a obtenção das funções de calibração, para avaliar o erro de justeza, e pela análise repetida de determinadas soluções ao longo da análise, para avaliar a estabilidade da quantificação (precisão).

A primeira etapa da verificação das funções de calibração é a avaliação do erro de justeza e da precisão associada à análise dos padrões de calibração. A avaliação do erro de justeza envolve o cálculo do erro relativo ( $E_r$ ), que é realizado automaticamente pelo *software* do equipamento (*PlasmaLab*), através da seguinte expressão matemática:

$$E_r(\%) = \frac{C_{exp} - C_{ref}}{C_{ref}} \times 100$$

Equação 29

em que:

$C_{exp}$  (µg/L) – Concentração experimental, calculada com a função de calibração obtida;  
 $C_{ref}$  (µg/L) – Concentração de referência, calculada com base nas várias etapas de preparação dos padrões de calibração.

Valores elevados de  $E_r$  podem ser explicados por algum problema no equipamento durante a leitura do sinal analítico ou devido à ocorrência de erros na preparação dos padrões de calibração, tais como: mau estado de conservação das soluções-padrão comerciais a partir das quais são preparados os padrões de calibração, contaminação dos recipientes usados na preparação, erros nas medições dos volumes a diluir, etc. Nestes casos, a função linear obtida pode ter os seus valores de declive e ordenada na origem “deslocados” relativamente aos valores reais, conduzindo a valores irreais para as concentrações calculadas, i.e. valores de concentração com um elevado erro de justeza.

A avaliação da precisão é realizada por intermédio do cálculo do coeficiente de variação (desvio-padrão relativo) de repetibilidade ( $CV_r$ ) das réplicas de determinação da concentração de cada um dos padrões de calibração, que é também realizado de forma automática pelo *PlasmaLab*, através da seguinte equação matemática:

$$CV_r(\%) = \frac{s_r}{C_{méd}} \times 100$$

Equação 30

em que:

$s_r$  (µg/L) – Desvio-padrão das réplicas de determinação da concentração, em condições de repetibilidade, de cada um dos padrões de calibração;

$C_{méd}$  (µg/L) – Média das concentrações calculadas nas várias réplicas de análise, em condições de repetibilidade, de cada uma das soluções-padrão calibração.

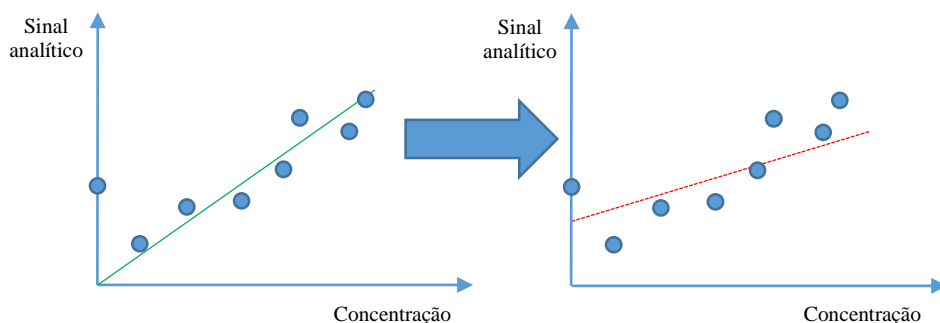
Valores elevados de  $CV_r$  podem dever-se, por exemplo, a uma aspiração deficiente do padrão de calibração e/ou da solução de padrão interno, à introdução de contaminações durante a aspiração ou à concentração reduzida (<LQ instrumental) de analito na solução.

Foram incluídos para o cálculo das funções de calibração os padrões que cumpram os seguintes critérios:  $E_r \leq 10\%$  e  $CV_r \leq 10\%$ , de acordo com o grau de exigência considerado normalmente no LCA. Esses critérios baseiam-se no estipulado na lei referente à qualidade da água de consumo humano (Decreto-Lei nº 306/2007) para os parâmetros químicos quantificáveis com as técnicas de ICP. Nesse documento são indicados como requisitos de precisão e erro de justeza (que nesse documento é referido como “exactidão”), que os valores

associados a estas características de desempenho do sistema analítico não sejam superiores a 10% para a maioria dos parâmetros (elementos) quantificáveis com técnicas de ICP.

Idealmente, considerando os procedimentos internos do LCA, após a exclusão dos padrões que não cumprem os requisitos referidos para precisão (repetibilidade) e a justeza, o número total de padrões/pontos que definem a função de calibração não deverá ser inferior a cinco. Este critério baseia-se no estabelecido na norma de referência a partir da qual o LCA definiu o seu procedimento de análise de águas por ICP-MS (ISO 17294-2:2003). Essa norma estabelece que, numa fase inicial da avaliação do sistema analítico, deverão ser usados pelo menos 5 pontos na definição das funções de calibração (4 padrões e um branco). Essa norma refere também que em trabalho de rotina poderão ser usados apenas dois ou três pontos para definir a função de calibração (incluindo o branco), desde que a validade dessa função seja avaliada com uma solução de controlo adequada. Como em todas as análises realizadas a validade das funções de calibração obtidas foi avaliada através da análise de soluções de controlo, quando foram obtidas funções de calibração com um número de pontos inferiores a esse limite, estas não foram rejeitadas, desde que cumprissem os critérios de qualidade definidos para a análise de soluções de controlo.

O critério definido para incluir o branco de calibração na definição da função de calibração foi que este originasse um sinal analítico inferior ao obtido para o padrão de menor concentração (que, por sua vez, cumpre os requisitos de  $E_r$  e  $CV_r$  já referidos). O controlo do branco de calibração é uma questão relevante no contexto da calibração pesada, pois, como representado na **Figura 38**, essa solução exerce uma forte influência na definição da função de calibração.



**Figura 38** – Efeito na função de calibração de um branco de calibração com um nível de contaminação diferente (significativamente superior) ao dos padrões de calibração.

O efeito representado na **Figura 38** pode ser explicado por uma contaminação do branco de calibração após a preparação dos padrões de calibração, o que explica o desfasamento do ponto correspondente relativamente à reta obtida. Se a contaminação do



branco fosse anterior à preparação dos padrões de calibração, todos estes estariam afetados pelo mesmo erro sistemático, o que iria resultar na deslocação de toda a reta (e não de um único ponto) para valores superiores de sinal analítico, originando um erro fixo/translacional.

Após a obtenção da função de calibração, o seu erro de justeza deve ser avaliado com a análise de soluções de controlo. Cada solução usada nessa avaliação é designada por “padrão de verificação da função de calibração” (PVFC) (**Tabela 10**).

Neste trabalho foram usados vários tipos de soluções de controlo, nomeadamente soluções provenientes dos ensaios de aptidão de águas (EAA) coordenados pela RELACRE. Essas soluções serão designadas neste documento por “RELACRE junho 2012” e RELACRE julho 2014”. Na **Tabela 43** (Anexos) são apresentados os valores de concentração de referência nesses materiais, com as respetivas incertezas associadas.

A avaliação do erro de justeza na análise das soluções usadas como PVFC é normalmente realizada recorrendo ao cálculo da percentagem de recuperação ( $R$ ):

$$R(\%) = \frac{C_{exp}}{C_{ref}} \times 100$$

Equação 31

em que:

$C_{exp}$  (µg/L) – Concentração experimental (calculada com a função de calibração);

$C_{ref}$  (µg/L) – Concentração de referência.

O LCA considera normalmente o seguinte critério geral para definir um erro de justeza aceitável:  $90\% \leq R \leq 110\%$ , o que corresponde a um valor máximo absoluto de  $E_r$  de 10%. Analisando a **Tabela 43**, verifica-se que a maioria das concentrações de referência das soluções distribuídas pela RELACRE possuem uma incerteza expandida relativa superior a 10%. Portanto, a obtenção de  $E_r \geq 10\%$  na análise de alguns dos elementos nessas soluções não significa que a função de calibração seja desadequada, pois essa diferença está incluída no intervalo definido pela incerteza associada ao valor de referência. Por esse motivo, neste trabalho considerou-se o  $z$ -score como critério inicial na análise desse tipo de solução de referência, um parâmetro que traduz o afastamento de uma medição, em termos de múltiplos do desvio-padrão, relativamente ao valor médio de uma população de medições, considerando uma distribuição normal (**Figura 39**).

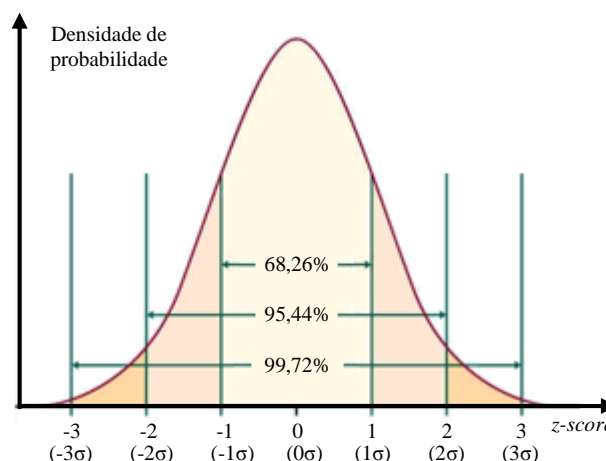


Figura 39 – Distribuição normal e relação entre os níveis de confiança e o desvio-padrão da distribuição

$$z - score = \frac{C_{exp} - C_{ref}}{s_{ref}}$$

Equação 32

em que:

$C_{exp}$  (µg/L) – Concentração experimental (calculada com a função de calibração);

$C_{ref}$  (µg/L) – Concentração de referência;

$s_{ref}$  (µg/L) – Medida de desvio (desvio-padrão) de referência (**Tabela 43**).

A avaliação do desempenho do laboratório numa determinada medição, por intermédio do cálculo do  $z$ -score, é realizada normalmente de acordo com os critérios apresentados na **Tabela 11** (RELACRE 1996). Todavia, no âmbito dos ensaios de aptidão de águas (EAA), a RELACRE, não estabelece qualquer critério para classificar o desempenho como questionável, considerando que o desempenho da quantificação é satisfatório se forem obtidos valores de  $z$ -score no intervalo entre -3 e 3, na análise das soluções aquosas distribuídas. Esta condição é bastante prudente, no sentido em que envolve uma probabilidade muito pequena ( $\approx 0,3\%$ ) de classificar o desempenho do laboratório como insatisfatório quando na realidade este é satisfatório. Assim, no âmbito deste trabalho, considerou-se como critério inicial para a validação das funções de calibração valores de  $z$ -score incluídos no intervalo referido ( $-3 \leq z\text{-score} \leq 3$ ).

Tabela 11 – Critérios típicos de  $z$ -score para avaliação do desempenho do laboratório na medição de uma determinada propriedade (RELACRE 1996).

Intervalo de valores de $z$ -score	Desempenho
$[-2,2]$	Satisfatório
$[-3,-2[ \wedge ]2,3]$	Questionável
$] -\infty,-3[ \wedge ]3,\infty]$	Insatisfatório

Outra solução usada como PVFC foi o MRC NIST SRM 1643e (MRC de água de consumo humano). A incerteza expandida associada às concentrações de referência dos vários elementos nessa solução é muito reduzida ( $<2\%$ , para a maioria dos elementos, como indicado na **Tabela 43**). Considerando como  $s_{ref}$  as incertezas-padrão das concentrações de referência, seria praticamente impossível cumprir o critério de  $z$ -score referido anteriormente, devido à incerteza associada ao sistema analítico usado na quantificação e à reduzida diferença entre  $C_{exp}$  e  $C_{ref}$  que teria de ser obtida. Assim, na análise deste material considerou-se como critério inicial de conformidade dos resultados a obtenção de  $90\% \leq R \leq 110\%$  ou  $-10\% \leq E_r \leq 10\%$ .

Outro tipo de solução usado normalmente no LCA na avaliação do erro de justeza é o padrão de verificação do limite de quantificação (PVLQ). A preparação deste padrão é realizada de maneira a que as concentrações dos vários elementos nessa solução correspondam aos limites mínimos das respectivas gamas de trabalho (limites de quantificação – LQ). Na fase inicial deste trabalho, este padrão não foi analisado, pois os LQ referentes aos vários elementos não se encontravam ainda definidos, tendo sido posteriormente estabelecidos com base nos resultados obtidos nas primeiras análises realizadas por ICP-MS no âmbito deste trabalho, para as quais se verificou o cumprimento dos critérios de controlo de qualidade associados à obtenção das funções de calibração ( $E_r \leq 10\%$  e  $CV_r \leq 10\%$ ).

Para uma correta avaliação da eficiência da quantificação na zona do LQ, o PVLQ não pode ser preparado a partir da mesma solução que é usada para a preparação dos padrões de calibração, pois um eventual erro de justeza associado à concentração nessa solução manifestar-se-ia da mesma forma nos padrões de calibração e no PVLQ, não sendo, por isso, detetado. Assim, foi preparado um novo “padrão pai”, designado por “CT2”, a partir do qual foi obtido, por diluição, o PVLQ. A preparação da solução “CT2” foi realizada por diluição do padrão comercial “*MERCK ICP multi-element standard solution VI*”, realizando os reforços necessários, de forma análoga ao já referido na descrição da preparação do “padrão pai” a partir do qual foram obtidos os padrões de calibração (“CT1”). O critério para a avaliação da quantificação do PVLQ foi o indicado anteriormente:  $90\% \leq R \leq 110\%$  ou  $10\% \leq E_r \leq 10\%$ .

De notar que os requisitos indicados para o controlo do erro de justeza através da análise do PVFC e do PVLQ são critérios iniciais de aceitação/rejeição de resultados, podendo ser reajustados em função da realidade do laboratório.

As estratégias de avaliação das funções de calibração descritas referem-se a verificações que são realizadas logo após a obtenção dessas funções, para avaliar o erro de justeza antes da análise das soluções com concentração desconhecida. A avaliação da estabilidade da quantificação (precisão) foi realizada por análise repetida das soluções usadas como PVFC.

No início do trabalho, as soluções usadas para avaliar o erro de justeza associado à função de calibração (soluções distribuídas pela RELACRE e MRC NIST 1643e) foram usadas também na avaliação da estabilidade da quantificação. Contudo, com o aumento da quantidade de soluções a analisar, e para minimizar o consumo desse tipo de solução de controlo, optou-se por preparar novas soluções para controlar a estabilidade da quantificação. Neste contexto, foi preparada uma solução por diluição de 1,25 mL da solução “CT2”, num volume final de 25 mL, para obter uma concentração correspondente ao ponto intermédio da gama de trabalho, sendo essa solução designada por PVFC(CT2).

Quando se verificou o incumprimento dos requisitos definidos para o controlo de qualidade dos resultados, procedeu-se à rejeição desses resultados e sempre que possível à repetição das respetivas análises.

- **Requisitos de controlo de qualidade adotados neste trabalho**

Tendo em conta a informação apresentada nesta secção, na **Tabela 12** é feito um resumo dos vários requisitos de controlo de qualidade considerados neste trabalho.

**Tabela 12 – Requisitos de controlo da qualidade considerados neste trabalho**

Tipo de avaliação	Parâmetro/Solução de controlo	Requisito
<b>Função de calibração</b>	Coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ )	$\geq 0,9990$
	Nº de pontos/padrões	$\geq 5$
	Resíduos ( $E_r$ )	$\leq 10\%$
	Coeficiente de variação de repetibilidade (3 réplicas de leitura) ( $CV_r$ )	$\leq 10\%$
<b>Justeza</b>	PVFC	$90\% \leq R \leq 110\%$ ou $3 \leq z\text{-score} \leq 3$
	PVLQ	$90\% \leq R \leq 110\%$
	Reforços ( <i>spikes</i> )	$80\% \leq R \leq 120\%$
<b>Precisão</b>	$CV_r$	$\leq 10\%$
	PVFC	Diferença relativa $\leq 10\%$ (leituras em blocos de verificação sucessivos)

### 3.2.9. Avaliação dos parâmetros de validação

O LCA possui um documento interno que define o procedimento genérico de validação de métodos para a análise de matrizes diversas com as técnicas de ICP. Esse documento interno foi elaborado com base em vários documentos externos, nomeadamente normas, guias e artigos científicos, mas também na experiência adquirida no âmbito dos trabalhos desenvolvidos no LCA. Uma vez que o trabalho apresentado neste documento decorreu da realização de um Estágio no LCA, esse documento interno de validação foi tido como a principal referência na validação do sistema analítico de quantificação de elementos químicos em cabelo por ICP-MS.

O LCA possui ainda um modelo de declaração de validação, na qual se baseiam as tabelas-resumo que serão apresentadas para os elementos abrangidos pela validação realizada neste trabalho. Nessas tabelas são apresentados os requisitos definidos para as várias características de desempenho avaliadas e os respetivos resultados obtidos na avaliação das características de desempenho, considerando esses requisitos.

Nas próximas subsecções são apresentados os procedimentos considerados na avaliação das características de desempenho do sistema analítico desenvolvido.

- **Cartas de controlo**

Muitas das características de desempenho do sistema analítico foram avaliadas recorrendo a cartas de controlo. Na **Figura 40**, é apresentado um exemplo desse tipo de representação gráfica.

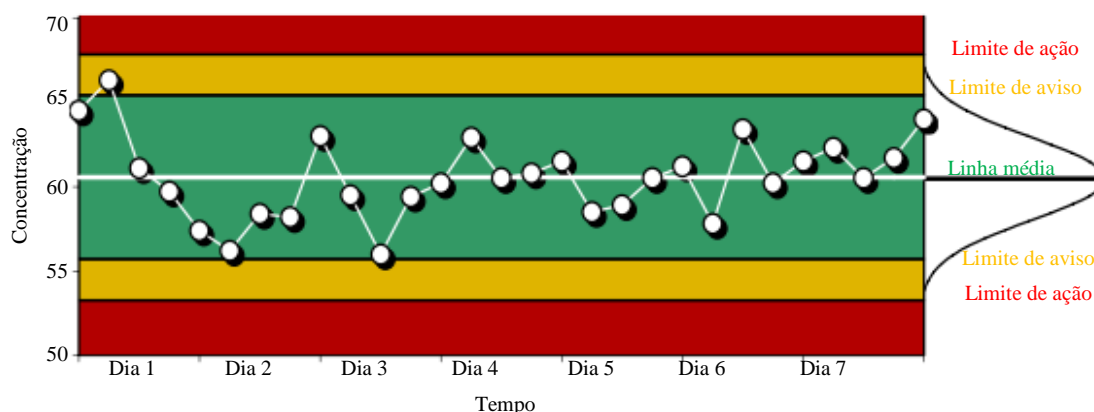


Figura 40 – Exemplo de carta de controlo e sua relação com a distribuição normal (Hovind *et al.* 2011)

As cartas de controlo incluem normalmente 5 linhas (RELACRE 1998, Hovind *et al.* 2011):

➤ **Linha média:** Representa a média dos dados usados para construir a carta de controlo;

➤ **Limite inferior e superior de aviso:** Abrangem o intervalo de valores correspondente a um nível de confiança de ≈95%. Considerando uma distribuição normal, estas linhas são definidas pela soma (linha superior) ou subtração (linha inferior) de duas vezes o desvio-padrão dos dados;

➤ **Limite inferior e superior de ação:** Abrangem o intervalo de valores correspondente a um nível de confiança de ≈99%. Considerando uma distribuição normal, estas linhas são definidas pela soma (linha superior) ou subtração (linha inferior) de três vezes o desvio-padrão dos dados.

Para as cartas de controlo com menos de 30 pontos, os limites foram calculados pela multiplicação do desvio-padrão por um valor *t* tabelado para a distribuição *t* de *Student*, considerando o respetivo grau de confiança pretendido (≈95% ou ≈99%) e o número de graus de liberdade foram definidos pela dimensão do conjunto de resultados (Miller *et al.* 2010).

- **Seletividade**

A seletividade é influenciada pela ocorrência de interferências durante a quantificação do analito, que se verificam devido à presença de espécies químicas diferentes do analito, mas que, em termos da propriedade medida para a quantificação, são indistinguíveis do analito. O procedimento de avaliação da seletividade adotado no LCA consiste num estudo de interferências, que envolve, no caso da técnica de ICP-MS, a realização de testes de recuperação e a análise de soluções que contenham a espécies químicas que possam interferir na quantificação do analito.

- **Testes de recuperação**

A avaliação da seletividade recorrendo aos testes de recuperação envolve o cálculo da recuperação da quantidade de analito (*R*) adicionada com a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{(C_f \times V_f) - (C_i \times V_i)}{(C_{ad} \times V_{ad})} \times 100$$

Equação 33

em que:

*C<sub>f</sub>* (μg/L) – Concentração (final) de analito na solução reforçada;

*V<sub>f</sub>* (L) – Volume (final) da solução reforçada;

*C<sub>i</sub>* (μg/L) – Concentração de analito na solução inicial;

*V<sub>i</sub>* (L) – Volume inicial da solução a reforçar;

*C<sub>ad</sub>* (μg/L) – Concentração de analito na solução de reforço;

*V<sub>ad</sub>* (L) – Volume da solução de reforço.

Note-se que a equação indicada corresponde a uma razão entre a estimativa instrumental da quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância que foi efetivamente adicionada. Idealmente, a recuperação do analito deverá estar próxima de 100%, o que corresponde à ausência de interferências associadas a efeitos de matriz.

O intervalo de aceitação de percentagens de recuperação foi estabelecido com base na construção de cartas de controlo e ajustado em função da incerteza calculada, tendo-se numa inicial considerados como válidos valores de recuperação entre 80% e 120% na análise de soluções reforçadas.

- **Análise de soluções contendo espécies químicas interferentes**

A quantificação com a técnica de ICP-MS está sujeita a interferências isobáricas, que se devem à existência de espécies químicas com valores de  $m/z$  não distinguíveis pelo detetor de massas, devido à sua resolução insuficiente. No LCA, a avaliação deste tipo de interferências, tem como referência um documento interno elaborado com base na norma ISO 17294-1:2004. Essa norma estabelece os princípios gerais da aplicação da técnica de ICP-MS na análise de água, apresentando uma estratégia para avaliar interferências isobáricas. Essa estratégia envolve a preparação de uma solução contendo apenas o interferente (i.e. sem o analito) numa concentração correspondente a pelo menos o dobro do expectável na matriz das amostras. Essa solução é analisada e avalia-se a concentração obtida para o analito que sofre a interferência.

A concentração significativa de interferente é definida como a concentração de interferente que origina uma concentração calculada para o analito superior ao respetivo LD. Se a concentração da espécie interferente nas amostras for inferior à concentração significativa, opta-se por não realizar qualquer correção de interferências. Por outro lado, se a concentração de espécie interferente nas amostras for superior à concentração significativa, então deve calcular-se um fator de interferência ( $f$ ), de acordo com o procedimento indicado na norma ISO 17294-1:2004.

O cálculo de  $f$  permite definir uma função que relacione os sinais do analito e da espécie interferente, que pode ser inserida no *PlasmaLab*, permitindo uma correção automática dos resultados obtidos. Considera-se que  $f$  foi bem calculado quando se verifica, após a aplicação da correção, que a concentração calculada para o analito na análise da solução contendo o interferente é inferior ao LD.

A estratégia de estudo das interferências apresentada exige um conhecimento prévio da composição da matriz, para prever as possíveis interferências que possam ocorrer.

Um dos elementos majoritários no cabelo é o enxofre (S) que corresponde a cerca de 5% da massa total do cabelo. Como esse elemento origina vários iões poliatômicos que interferem na quantificação de vários elementos (May *et al.* 1998), foi realizado o estudo de interferências para esse elemento (que é apresentado no capítulo 4 deste documento), de acordo com o procedimento referido.

- **Quantificação**

- **Gama de trabalho, parâmetros de calibração, linearidade e limiares analíticos**

Existem dois tipos de gama de trabalho em métodos que envolvem etapas de tratamento da amostra, a gama de trabalho instrumental e a gama de trabalho metodológica. A gama de trabalho metodológica é mais difícil de avaliar, uma vez que a sua determinação exige os seguintes requisitos (Eurachem 2014):

- Amostras com concentração conhecida e brancos de amostra (amostra sem o analito);
- As amostras devem ser sujeitas a todo o procedimento analítico, incluindo as etapas de tratamento da amostra (lavagem, secagem, digestão);
- As amostras devem incluir um conjunto de concentrações que abranja todo o intervalo de interesse;
- O instrumento usado para a quantificação deverá ter sido devidamente calibrado.

Tendo em conta os requisitos apresentados, não foi possível avaliar a gama de trabalho metodológica, devido à inexistência de amostras de cabelo com concentração conhecida que pudessem ser sujeitas a todo o procedimento analítico. Embora tenham sido usados MRC de cabelo, que são amostras com concentração conhecida para vários elementos, esse material não pode ser usado para avaliar a gama de trabalho metodológica, uma vez que não é possível aplicar todas as etapas do sistema analítico desenvolvido a esse tipo de amostras e, portanto, é impossível cumprir o segundo critério referido. Para além disso, devido ao número reduzido de MRC usados neste trabalho, mesmo que estes pudessem ser sujeitos a todas as etapas do procedimento analítico, não seria possível fazer uma avaliação da linearidade associada a toda a gama de concentrações avaliada. Procedeu-se, contudo, à avaliação dos parâmetros instrumentais (associados à calibração), de acordo com os procedimentos descritos a seguir.



- **Limites analíticos instrumentais**

Neste trabalho, optou-se por definir o LQ como sendo a concentração correspondente ao padrão de menor concentração da função de calibração, ou seja, como a concentração mínima para a qual se verificou o cumprimento dos requisitos de controlo de qualidade estabelecidos. O LD foi definido como 1/3 do valor do LQ. A validade dos LD e LQ definidos desta forma foi avaliada recorrendo à análise de brancos e do PVLQ, através da construção de cartas de controlo.

- **Função de calibração**

O procedimento de validação do LCA define as seguintes condições na avaliação do declive, ordenada na origem e coeficiente de correlação da curva de calibração:

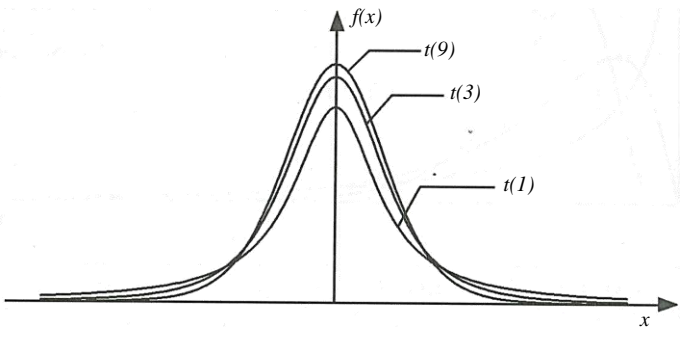
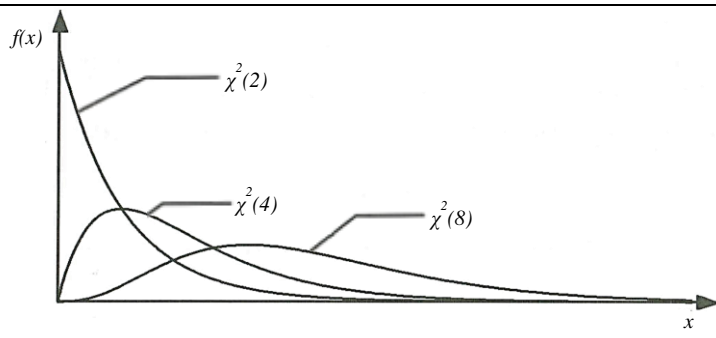
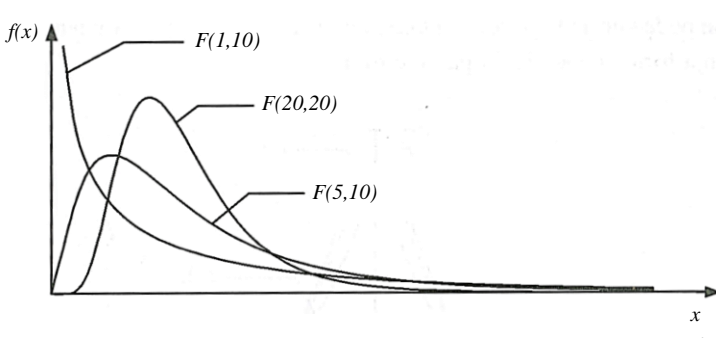
- **Requisitos mínimos para a validação:** 5 curvas de calibração independentes, obtidas em pelo menos 3 dias diferentes.
- **Declaração de validação:** indicação dos valores mínimo e máximo obtidos para o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), declive ( $m_w$ ) e ordenada na origem ( $b_w$ ), no conjunto de curvas de calibração considerado.

A verificação da linearidade da relação entre a resposta instrumental e a concentração de analito permite demonstrar que uma função matemática linear (i.e. um polinómio de grau 1) é o modelo ideal para a descrição da relação entre as duas variáveis consideradas. Essa verificação pode ser dividida em duas etapas:

1. Verificação da existência de uma forte correlação linear entre as duas variáveis consideradas;
2. Verificação de que o polinómio de grau 1 obtido por regressão é a função matemática ideal para modelar a relação entre as duas variáveis consideradas, i.e. verificação de que a reta obtida é um modelo de calibração adequado.

Os testes estatísticos que foram usados neste trabalho para a concretização de cada uma destas etapas são apresentados na **Tabela 13**, onde são também representadas as distribuições estatísticas que constituem a base teórica de aplicação de cada um desses testes.

Tabela 13 – Testes estatísticos aplicados neste trabalho para a avaliação da correlação linear das variáveis e do ajuste do modelo matemático de calibração e distribuições estatísticas em que se fundamentam (Cordeiro *et al.* 2004).

Tipo de avaliação	Designação do teste estatístico	Distribuição estatística
Correlação linear das variáveis	Teste <i>t</i>	 <p><b>Figura 41 – Distribuição <i>t</i> de Student.</b> A função densidade de probabilidade para a variável independente <math>x</math> é representada por <math>f(x)</math>. Os números entre parênteses são os graus de liberdade correspondentes a cada uma das formas da distribuição.</p>
Ajuste do modelo matemático de regressão e calibração	$\chi^2$ (chi-quadrado)	 <p><b>Figura 42 – Distribuição <math>\chi^2</math> (chi-quadrado) (soma dos quadrados de variáveis com distribuição normal).</b> A função densidade de probabilidade para a variável independente <math>x</math> é representada por <math>f(x)</math>. Os números entre parênteses são os graus de liberdade correspondentes a cada uma das formas da distribuição.</p>
	ANOVA “pesada”	 <p><b>Figura 43 – Distribuição de Fisher (razão entre variáveis com distribuição <math>\chi^2</math>).</b> A função densidade de probabilidade para a variável independente <math>x</math> é representada por <math>f(x)</math>. Os números entre parênteses são os graus de liberdade correspondentes a cada uma das formas da distribuição.</p>
	Mandel	

Não existem testes estatísticos que permitam uma avaliação direta da linearidade, existindo, contudo, testes que permitem uma avaliação indireta desse fator através da verificação do grau de correlação linear dos dados e do ajuste do modelo matemático usado para descrever a relação entre as variáveis (Committee 1994). Cada um desses testes baseia-se no cálculo, com base nos dados experimentais, de um valor que segue uma determinada

distribuição estatística, designado por “estatística de teste” que é comparado com um valor teórico, designado por “valor crítico”. Essa comparação permite obter conclusões relativamente ao fator avaliado (Cordeiro *et al.* 2004).

A avaliação da correlação linear envolve o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Este parâmetro estatístico é um dos que leva a maiores confusões de interpretação. É comum considerar-se, erradamente, este parâmetro como característica da função linear usada para modelar a variação da variável dependente (sinal instrumental) em função da variável independente (concentração do analito), quando este é uma característica dos dados experimentais.

Um valor elevado de  $r$  é indicativo de que existe uma forte correlação linear das variáveis, mas é necessário comprová-la. Assim, após o cálculo de  $r$ , é necessário avaliar se este possui significância estatística, ou seja, se é improvável que o resultado obtido para  $r$  tenha ocorrido casualmente. No contexto da calibração, a significância do valor de  $r$  depende do número ( $n$ ) de padrões usados. Assim, a significância de  $r$  pode ser avaliada através de um teste  $t$  bilateral de comparação de médias, no qual são considerados os valores de  $r$  e de  $n$ . O valor de  $r$  obtido é comparado com o valor médio  $\rho$  do coeficiente de correlação para uma população de variáveis não-correlacionadas ( $\rho = 0$ ), considerando o desvio-padrão da distribuição estatística dos coeficientes de correlação ( $s_r$ ). O parâmetro estatístico para aplicação desse teste é calculado de acordo com a seguinte equação (Miller *et al.* 2010):

$$t_{calc} = \frac{|r| - \rho}{s_r} = \frac{|r| - 0}{\sqrt{(1 - r^2) + (n - 2)}} = \frac{|r|\sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

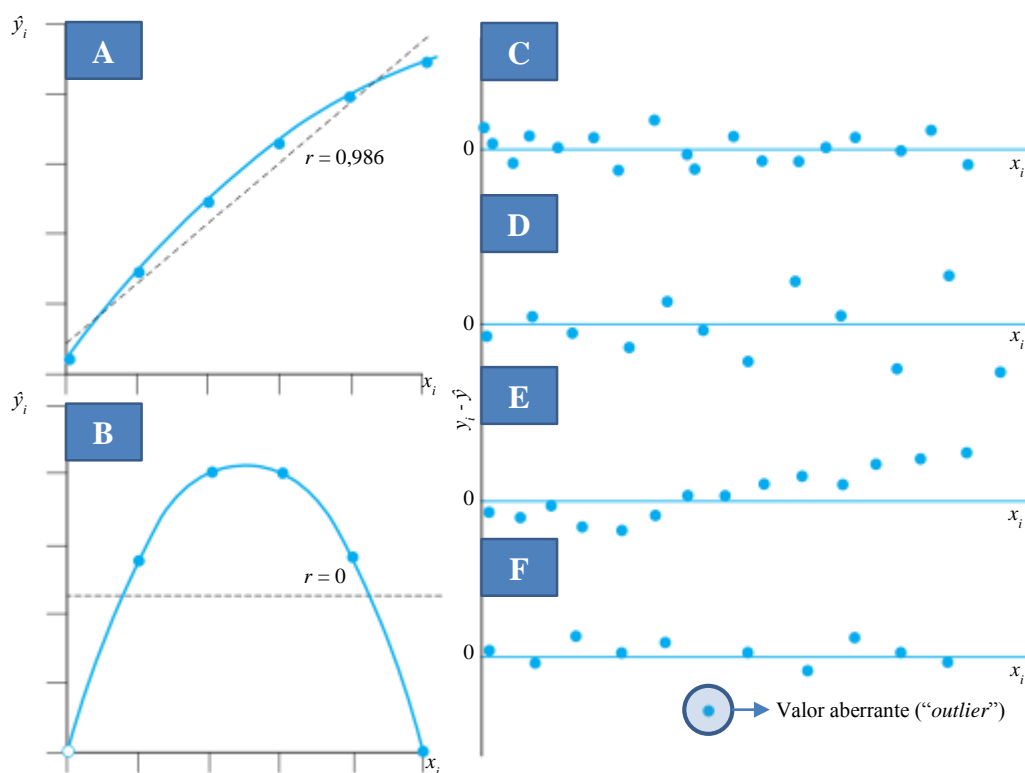
Equação 34

A estatística de teste ( $t_{calc}$ ) é comparada com um valor de  $t$  teórico tabelado ( $t_{crit}$ ) para um determinado nível de significância  $\alpha$  (probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando esta é verdadeira) e  $n-2$  graus de liberdade. Como a hipótese nula do teste de hipóteses referido corresponde à inexistência de correlação linear ( $H_0: r = \rho = 0$ ), podem ser obtidas as seguintes conclusões (Miller *et al.* 2010):

- Se  $t_{calc} < t_{crit}$ ,  $H_0$  não é rejeitada, concluindo-se que não existe correlação linear;
- Se  $t_{calc} > t_{crit}$ ,  $H_0$  é rejeitada, verificando-se uma correlação linear significativa.

A não rejeição da hipótese nula do teste estatístico apresentado é uma condição necessária, mas não suficiente para garantir que o modelo linear proporciona um ajuste adequado aos dados experimentais. Uma forte correlação linear origina sempre valores de  $r$

próximos da unidade, mas o inverso não se verifica, i.e. um valor de  $r$  próximo da unidade não implica necessariamente que o modelo matemático que melhor descreve a correlação dos dados experimentais é uma função linear (Committee 1994, Asuero *et al.* 2006). Para além disso, um valor de  $r$  próximo de zero não significa que não exista correlação entre as variáveis, mas sim que essa correlação, se existir, não é linear (Asuero *et al.* 2006, Miller *et al.* 2010). Portanto, para avaliar o ajuste do modelo linear é necessário recorrer a outras ferramentas estatísticas para além do cálculo de  $r$ . Uma das ferramentas usadas neste trabalho para esse tipo de avaliação foi, para além dos testes estatísticos referidos **Tabela 13**, a análise dos gráficos de resíduos, pois este tipo de análise permite obter algumas conclusões relativamente às características do modelo matemático, como representado na **Figura 44**.



**Figura 44 – Possíveis interpretações erróneas do coeficiente de correção de Pearson ( $r$ ) (A e B) e gráficos de resíduos para avaliação do ajuste da função linear aos dados experimentais (C, D, E e F) (Miller *et al.* 2010). A: Obtenção de um valor elevado de  $r$  para um conjunto de dados que se correlaciona por um modelo quadrático; B: Obtenção de um valor nulo de  $r$  para um conjunto de dados que se correlaciona perfeitamente de acordo com um modelo quadrático. As linhas a tracejado em A e B correspondem às funções de calibração lineares obtidas com o método dos mínimos desvios quadrados. C: Distribuição satisfatória (aleatória) dos resíduos; D: Aumento dos resíduos com o aumento da concentração dos padrões, o que indica um aumento da variância associada às leituras de sinal analítico (heterocedasticidade); E: Tendência clara na distribuição dos resíduos (6 primeiros resíduos com valores negativos e os 8 seguintes com valores positivos); F: Gráfico de resíduos satisfatório, mas com a presença de um valor aberrante ("outlier").**

A análise dos gráficos dos resíduos foi realizada por inspeção visual e, sempre que possível, foi aplicado o teste de Wald-Wolfowitz, que permite avaliar se uma determinada

sequência de resíduos positivos e negativos apresenta uma tendência com significância estatística. O princípio deste teste consiste nas seguintes etapas (Miller *et al.* 2010):

1. Contagem do número de pontos correspondentes a valores positivos ( $P$ ) e negativos ( $N$ ) de resíduos e do número de sequências ( $K_{obs}$ ) de cada um desses tipos de pontos;
2. Comparação do número de sequências obtido com o valor tabelado para o par de valores  $P$  e  $N$  observados ( $K_{tab}$ ).

Como a hipótese nula ( $H_0$ ) deste teste é uma distribuição aleatória dos resíduos, podem ser obtidas as seguintes conclusões (Miller *et al.* 2010):

- Se  $K_{obs} \leq K_{tab}$ , não existe evidência de que a distribuição dos resíduos não seja aleatória;
- Se  $K_{obs} > K_{tab}$ , existe evidência de que a distribuição dos resíduos não é aleatória.

Embora útil, este teste é bastante limitado, pois para poder ser aplicado é necessário que exista um número relativamente elevado de padrões para a determinação da função de calibração, o que nem sempre se verifica (raramente são usados mais de 10 padrões).

Na **Tabela 14** é feito um resumo das várias equações envolvidas na aplicação dos testes estatísticos de avaliação do ajuste do modelo matemático de calibração referidos. Os símbolos usados estão de acordo com o indicado na **Tabela 7**.

**Tabela 14** – Equações usadas nas várias estratégias adotadas neste trabalho para avaliação do ajuste do modelo matemático de calibração aos dados experimentais

Teste estatístico	Designação/Símbolo	Equação matemática/Descrição	Legenda
$\chi^2$	Soma dos quadrados dos resíduos ( $S_{w,res}$ )	$S_{w,res} = \sum_i \sum_j w_i (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	Equação 19*
ANOVA “pesada”	Soma dos quadrados da falta de ajuste do modelo ( $S_{w,FA}$ )	$S_{w,FA} = \sum_i k_i \times w_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	Equação 35
	Soma dos quadrados do erro puramente experimental ( $S_{w,PE}$ )	$S_{w,PE} = \sum_i \sum_j w_i (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	Equação 36
	Soma dos quadrados dos desvios da regressão ao valor médio ( $S_{w,reg}$ )	$S_{w,reg} = \sum_i (k_i \times w_i (\hat{y}_i - \bar{y}))$	Equação 37
	Soma dos quadrados total ( $S_{w,total}$ )	$S_{w,total} = \sum_j \sum_i w_i (y_{ij} - \bar{y})^2$	Equação 38
Teste de Mandel	Variância residual ( $S_{wy,p}$ )**	$S_{wy,p} = \sqrt{\frac{S_{wy}}{n - p}}$	Equação 39
	$F_{calc}$	$F_{calc} = \frac{(n - 2) \times s_{wy,2}^2 - (n - 3) \times s_{wy,3}^2}{s_{wy,3}^2}$	Equação 40

**Notas:** \* → Equação já apresentada na Tabela 8 (Na Tabela 8,  $\hat{y}_i$  corresponde à estimativa do sinal analítico considerando o modelo de calibração linear, enquanto na Tabela 14 corresponde à estimativa do sinal analítico considerando um qualquer modelo matemático de calibração.)

\*\* →  $p$  – Número de coeficientes do modelo matemático de calibração: para o modelo linear,  $p = 2$ , e para o modelo quadrático  $p = 3$ .

Assumindo que os sinais analíticos possuem uma distribuição normal, em que  $\hat{y}_i$  e  $s_i$  correspondem, respectivamente, a estimativas da média e do desvio-padrão dessa distribuição, então o quociente  $(y_{ij} - \hat{y}_i)/s_i$  pode ser interpretado como um *z-score*, que possui (por definição) uma distribuição normal. Portanto,  $S_{w,res}$  segue uma distribuição do tipo  $\chi^2$ , pois é uma soma de quadrados de variáveis (*z-scores*) com distribuição normal. Assim, uma forma expedita de avaliar o ajuste da função de calibração é a aplicação de um teste  $\chi^2$ , em que  $S_{w,res}$  corresponde à estatística de teste ( $\chi^2_{calc}$ ) que é comparada com um valor crítico de  $\chi^2$  ( $\chi^2_{crit}$ ), tabelado para um determinado nível de confiança e para um dado número de graus de liberdade. O número de graus de liberdade neste caso corresponde à diferença entre o número total de leituras de sinal para a obtenção da função de calibração ( $\sum k_i$ ) e o número de parâmetros  $p$  do modelo matemático (Committee 1994). Considerando o modelo linear ( $p = 2$ ) e o número de réplicas ( $k_i$ ) de leitura de cada padrão,  $\chi^2_{crit}$  é o valor tabelado para a distribuição chi-quadrado considerando um nível de significância  $\alpha$  e  $(\sum k_i) - 2$  graus de liberdade.

As conclusões obtidas após a aplicação do teste  $\chi^2$  são as seguintes (Committee 1994):

- Se  $\chi^2_{calc} \leq \chi^2_{crit}$ , não é evidenciado que existe uma falta de ajuste significativa do modelo linear aos dados experimentais;
- Se  $\chi^2_{calc} > \chi^2_{crit}$ , existe uma falta de ajuste significativa do modelo linear aos dados experimentais.

Uma outra forma de avaliação da falta de ajuste da função de calibração é a aplicação de um teste ANOVA (Committee 1994). Este teste envolve o mesmo tipo de cálculos para os modelos de calibração linear pesados e não pesados, contudo, no caso do modelo linear pesado, as equações usadas incluem um termo associado à variância das leituras repetidas de cada padrão, que reflete o peso que cada um dos padrões terá na definição do modelo matemático de calibração. Este teste estatístico, que pode ser visto como uma “ANOVA pesada”, fundamenta-se nas seguintes relações entre as somas de quadrados pesados apresentadas na Tabela 15 (Committee 1994):

$$\begin{cases} S_{w,res} = S_{w,FA} + S_{w,PE} \\ S_{w,total} = S_{w,res} + S_{w,reg} \end{cases} \Leftrightarrow S_{w,total} = S_{w,FA} + S_{w,PE} + S_{w,reg}$$

Após o cálculo das várias somas de quadrados pesados, o teste ANOVA é concretizado por aplicação dos cálculos apresentados na **Tabela 15**. Note-se que este tipo de teste pode ser aplicado a uma função de calibração polinomial de qualquer grau, desde

que os graus de liberdade sejam ajustados em função do número de coeficientes do modelo matemático (para o modelo linear tem-se  $p = 2$ ).

Tabela 15 – Equações usadas no teste de avaliação do ajuste da função de calibração através de uma “ANOVA pesada”

Fonte de variabilidade	Soma dos quadrados pesados	Graus de liberdade	Média da soma dos quadrados (MQ)	Teste de falta de ajuste
<b>Ajuste do modelo</b>	$S_{w,FA} = \sum_i k_i \times w_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_{FA} = \frac{S_{w,FA}}{n - p}$	$F_{calc} = \frac{MQ_{FA}}{MQ_{EE}}$
<b>Réplicas experimentais (repetibilidade)</b>	$S_{w,PE} = \sum_i \sum_j w_i (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\sum_i k_i - n$	$MQ_{PE} = \frac{S_{w,PE}}{\sum_i k_i - n}$	

No LCA, estabeleceu-se que a linearidade deve ser avaliada através do teste estatístico de Mandel. Esse teste de hipóteses corresponde a um teste  $F$  para a comparação das variâncias residuais associadas aos modelos de calibração linear e quadrático, que são estimadas recorrendo à **Equação 39**. Para aplicação do teste de Mandel, é calculado um valor de  $F$  ( $F_{calc}$ ), de acordo com a **Equação 40**, que é posteriormente comparado com um valor de  $F$  crítico ( $F_{crit}$ ) tabelado, para a distribuição de Fisher com 1 (numerador) e  $n-3$  (denominador) graus de liberdade ( $F_{\alpha,1,n-3}$ ). De notar que na **Equação 40**:

$n$  – número de pontos/padrões usados na interpolação da função de calibração;

$(s_{wy,2})^2$  – Variância residual associada ao modelo de calibração linear pesado;

$(s_{wy,3})^2$  – Variância residual associada ao modelo de calibração quadrático pesado.

Após a aplicação do teste de Mandel podem ser retiradas as seguintes conclusões (Brüggemann *et al.* 2006):

- Se  $F_{calc} \leq F_{crit}$ , as variâncias residuais associadas aos modelos linear e quadrático não são significativamente diferentes e, portanto, o modelo linear é adequado, pois o modelo quadrático não conduz a um ajuste significativamente melhor.
- Se  $F_{calc} > F_{crit}$ , as variâncias residuais associadas aos modelos linear e quadrático são significativamente diferentes e, portanto, a função quadrática conduz a um ajustamento significativamente melhor do modelo matemático aos dados experimentais.

Como no LCA são usados modelos pesados, o teste de Mandel terá de ser aplicado considerando os modelos pesados linear e quadrático. Para o modelo linear, as respetivas equações foram anteriormente apresentadas na **Tabela 8**. Alguns dos termos indicados nessa tabela são comuns aos modelos pesados linear e quadrático. Assim, na **Tabela 16** são apresentadas as equações específicas do modelo quadrático pesado, necessárias para a obtenção da respetiva função e aplicação do teste de Mandel.

Tabela 16 – Equações usadas no cálculo da função de calibração com o modelo quadrático pesado (Lavagnini *et al.* 2007)

Designação/Símbolo		Equação matemática/Descrição	Legenda
<b>Concentrações quadráticas pesadas</b> ( $\bar{x}_w^2$ )		$\bar{x}_w^2 = \frac{\sum_i w_i x_i^2}{n}$	<b>Equação 41</b>
<b>Somas de quadrados pesados (<math>S_w</math>)</b>	$S_{wfx}$	$S_{wfx} = \sum_i w_i x_i^3 - n \bar{x}_w \bar{x}_w^2$	<b>Equação 42</b>
	$S_{wff}$	$S_{wff} = \sum_i w_i x_i^4 - n (\bar{x}_w^2)^2$	<b>Equação 43</b>
	<b>Produtos cruzados dos desvios das concentrações quadráticas e dos sinais aos respetivos valores médios</b> ( $S_{wfy}$ )	$S_{wfy} = \sum_i w_i x_i^2 y_i - n \bar{x}_w^2 \bar{y}_w$	<b>Equação 44</b>
	<b>Diferença <math>\Delta</math></b>	$\Delta = S_{wxx} S_{wff} - S_{wfx}^2$	<b>Equação 45</b>
<b>Calibração</b>	<b>Modelo</b>	$\hat{y} = a_w x^2 + b_w x + c_w$	<b>Equação 46</b>
	<b>Termo quadrático (<math>a_w</math>)</b>	$a_w = \frac{S_{wxx} S_{wfy} - S_{wfx} S_{wxy}}{\Delta}$	<b>Equação 47</b>
	<b>Termo linear (<math>b_w</math>)</b>	$b_w = \frac{S_{wff} S_{wfy} - S_{wfx} S_{wfy}}{\Delta}$	<b>Equação 48</b>
	<b>Termo constante/ordenada na origem (<math>c_w</math>)</b>	$c_w = \bar{y}_w - (b_w \bar{x}_w + a_w \bar{x}_w^2)$	<b>Equação 49</b>
	<b>Coefficiente de correlação (<math>r</math>)</b>	$r = \frac{S_{wxy}}{\sqrt{S_{wxx} S_{wyy}}}$	<b>Equação 50</b>
<b>Desvio-padrão residual (<math>s_{wy}</math>)</b>		$s_{wy} = \sqrt{\frac{S_{wy}}{n - 3}}$ ( $S_{wy}$ calculado de acordo com a <b>Equação 19</b> )	<b>Equação 51</b>

○ **Gama de trabalho instrumental**

A gama de trabalho instrumental considerada neste trabalho foi definida como o intervalo de concentrações para o qual se verificou o cumprimento dos requisitos de definidos para o controlo de qualidade da função de calibração, i.e. como o intervalo de concentrações no qual se verificou uma exatidão (precisão e erro de justeza) satisfatória.


• **Precisão**

A avaliação da precisão envolve a repetição de medições numa mesma amostra. Neste trabalho, as condições de precisão avaliadas foram a repetibilidade e a precisão intermédia. A reprodutibilidade não foi avaliada, pois isso implica a realização da metodologia analítica desenvolvida num outro laboratório.

Na **Tabela 17** é feito um resumo dos fatores de variabilidade considerados neste trabalho na avaliação da precisão.



Tabela 17 – Fatores de variabilidade para os quais foram realizadas estimativas da precisão

Dispersão dos resultados	Tipo de avaliação	Fator de variabilidade	Descrição/Comentários	Medidas de dispersão
	<b>Variabilidade da leitura em cada aspiração de solução</b>	Tempo de análise (durante a aspiração de uma solução)	Dispersão dos resultados obtidos na medição da concentração em cada aspiração da solução da amostra	Coefficiente de variação (desvio-padrão relativo)
	<b>Repetibilidade da leitura instrumental (leituras consecutivas)</b>	Tempo de análise (mesmo dia)	Dispersão dos resultados obtidos na medição da concentração da solução considerando aspirações consecutivas da amostra	Coefficiente de variação (desvio-padrão relativo) e
	<b>Repetibilidade da digestão</b>	Vasos de digestão, recolha da amostra e tempo de análise (mesmo dia)	Dispersão dos resultados obtidos na medição da concentração, em condições de repetibilidade, de várias porções de uma mesma amostra, digerida ao mesmo tempo.	diferença relativa entre duplicados de leitura, considerando aspirações consecutivas
	<b>Precisão intermédia associada à leitura instrumental em diferentes dias</b>	Dias de análise (variação dos padrões de calibração, das condições de operação do equipamento, dos contentores das soluções, etc.)	Dispersão dos resultados obtidos na medição da concentração da mesma solução em diferentes análises realizadas em dias diferentes.	Coefficiente de variação (desvio-padrão relativo)

O sinal obtido na análise de cada solução por ICP-MS corresponde à média dos sinais obtidos em pelo menos três réplicas de análise realizadas ao longo da aspiração da solução. Assim, é obtido um desvio-padrão relativo, que constitui um coeficiente de variação (de repetibilidade) da leitura instrumental durante cada aspiração. Esse parâmetro permite avaliar as limitações da técnica relativamente aos níveis de concentração quantificáveis, pois tenderá para valores superiores quando a concentração determinada se encontra próxima do LQ e do LD. Permite ainda identificar eventuais problemas instrumentais, nomeadamente o final de vida do detetor, que se manifesta na obtenção de valores elevados desse parâmetro, devido a problemas durante pelo menos uma das réplicas de análise. O estudo do desempenho do sistema analítico relativamente a este parâmetro foi realizado através da representação gráfica dos vários valores obtidos ao longo da gama de trabalho definida para a concentração de analito, para identificar os valores desse parâmetro que correspondem à normalidade do funcionamento do equipamento e ainda a eventuais variações dos valores correspondente a esse parâmetro em função do nível de concentração do analito.

Entre a análise de cada uma das soluções, o equipamento de ICP.MS aspira uma solução de lavagem, para evitar a ocorrência de contaminação cruzada. Assim, uma outra medida da precisão da leitura instrumental é a repetibilidade associada à análise da mesma solução, com as respetivas medições intercaladas pela aspiração da solução de lavagem. A precisão associada a este processo foi avaliada recorrendo ao cálculo do coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) de 10 réplicas de leitura da mesma solução, nas referidas condições. A precisão foi ainda avaliada recorrendo à análise de duplicados, pois este é normalmente o número de réplicas usado em trabalho de rotina, através do cálculo da diferença relativa entre as análises em duplicado, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Diferença relativa (\%)} = \frac{|C_2 - C_1|}{C_m} \times 100$$

Equação 52

em que:

$C_2$  e  $C_1$  ( $\mu/L$ ) – Concentrações obtidas na leitura em duplicado.

$C_m$  ( $\mu/L$ ) – Média das concentrações obtidas na leitura em duplicado.

A repetibilidade do processo de digestão foi avaliada de forma idêntica à indicada no parágrafo anterior, mas em que as réplicas de análise foram realizadas em soluções independentes. Essas soluções independentes correspondem às diferentes porções digeridas de uma mesma amostra, no mesmo ciclo de digestão.

A precisão intermédia associada à quantificação em dias independentes foi realizada recorrendo à análise de variâncias (ANOVA), de acordo com um dos procedimentos indicados no guia da Eurachem referente à validação de métodos analíticos (Eurachem 2014). Esse teste ANOVA é do tipo unidimensional (variação de um fator: dias de análise) e envolve as relações matemáticas apresentadas na **Tabela 18**. Nessa tabela,  $p$  corresponde ao número de grupos (número de dias de análise),  $n$  corresponde ao número de leituras repetidas, em condições de repetibilidade, em cada grupo (dia de análise). O número total de determinações ( $N$ ) é dado pelo produto de  $n$  e  $p$ .

Tabela 18 – Tabela para aplicação de um teste ANOVA unidimensional

Fonte de variabilidade	Soma dos quadrados ( $S$ )	Graus de liberdade	Média da soma dos quadrados ( $MQ$ )	Teste $F$
<b>Entre grupos (diferentes dias)</b>	$S_{entre\ grupos}$	$p-1$	$MQ_{entre\ grupos} = S_{entre\ grupos}/(p-1)$	$F_{calc} = MQ_{entre\ grupos}/MQ_{resíduos}$
<b>Resíduos</b>	$S_{resíduos}$	$N-p$	$MQ_{resíduos} = S_{resíduos}/(N-p)$	
<b>Total</b>	$S_{TOTAL} = S_{entre\ grupos} + S_{resíduos}$	$N-1$		

O desvio-padrão associado à repetibilidade ( $s_{repetibilidade}$ ) é obtido a partir da seguinte equação:

$$s_{repetibilidade} = \sqrt{s_{resíduos}}$$

Equação 53

A contribuição da variância proveniente da variação entre grupos pode ser determinada através da seguinte expressão:

$$s_{entre\ grupos} = \sqrt{\frac{MQ_{entre\ grupos} - MQ_{resíduos}}{n}}$$

Equação 54

Por fim, a precisão intermédia ( $s_I$ ) é calculada a partir de:

$$s_I = \sqrt{s_{repetibilidade}^2 + s_{entre\ grupos}^2}$$

Equação 55

- **Justeza**

A avaliação da justeza da quantificação foi realizada recorrendo à análise de dois MRC de cabelo. Em cada uma das análises ao MRC foi calculada a percentagem de recuperação ( $R$ ), de acordo com a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{C_{MRC,experimental}}{C_{MRC}} \times 100$$

Equação 56

em que:

$C_{MRC,experimental}$  (µg/g) – Concentração obtida na análise do MRC de cabelo;

$C_{MRC}$  (µg/g) – Concentração de referência no MRC de cabelo.

Os valores de recuperação obtidos nas várias análises aos dois MRC de cabelo foram representados em cartas de controlo.

A justeza foi ainda avaliada recorrendo à digestão de padrões aquosos. O objetivo desta etapa da validação é demonstrar que a digestão não provoca perdas significativas do analito, ou, por outro lado, a introdução de contaminações. Esse procedimento envolve a preparação de soluções aquosas com concentrações conhecidas dos analitos que, idealmente, deverão abranger toda a gama de trabalho definida para o sistema analítico avaliado. De cada um dos padrões preparados foram retiradas duas alíquotas, às quais se adicionou o volume de  $HNO_3$  concentrado usado para as digestões de cabelo (4 mL). Uma das alíquotas foi submetida à digestão com aquecimento por micro-ondas, enquanto a outra foi diretamente

diluída sem ser sujeita à digestão. Os resultados obtidos na análise dessas soluções foram avaliados recorrendo à representação gráfica dos pares de concentrações obtidos, representando no eixo das abcissas a concentração dos padrões não digeridos e no eixo vertical a concentração dos padrões digeridos. Foi aplicada uma interpolação linear recorrendo ao método dos mínimos quadrados. Como cada par de padrões é preparado de maneira a que essas soluções tenham aproximadamente a mesma concentração, a inexistência de diferenças significativas entre as concentrações determinadas para os dois conjuntos de padrões é demonstrada pela obtenção de uma reta com declive próximo de 1 e ordenada na origem próxima de zero. Idealmente, os intervalos de confiança calculados para o declive a ordenada na origem deverão incluir, respetivamente, o declive unitário e a ordenada na origem nula.

- **Incerteza**

A incerteza associada à medição com um determinado sistema analítico pode ser avaliada de duas formas: “*bottom-up*” e “*top-down*”.

Como a abordagem “*bottom-up*” envolve a estimativa da incerteza associada às várias etapas do método analítico, essa estratégia possui a vantagem de permitir identificar as etapas que contribuem mais significativamente para a incerteza global, o que possibilita a implementação de medidas que permitam reduzir a incerteza associada a essas etapas críticas. Contudo, alguns trabalhos demonstram que este tipo de estratégia leva muitas vezes à obtenção de estimativas da incerteza que são inferiores à incerteza real do sistema analítico considerado. Essa diferença deve-se à dificuldade em identificar todas as possíveis contribuições para a incerteza em alguns sistemas analíticos, devido à sua complexidade (Thompson *et al.* 2011). A “*dark uncertainty*” é um termo apresentado em algumas publicações que designa a componente de incerteza que não é considerada e que se reflete na obtenção de estimativas desajustadas para a incerteza global dos sistemas analíticos (Thompson *et al.* 2011, Analytical Methods Committee 2012).

A estratégia “*top-down*” de estimativa da incerteza pode ser adotada recorrendo aos dados obtidos na validação dos sistemas analítico e no respetivo controlo de qualidade. Esse tipo de abordagem tem a desvantagem de não permitir a identificação das etapas que contribuem mais significativamente para a incerteza global, mas conduz normalmente à obtenção de estimativas mais realistas da incerteza, pois a incerteza é estimada considerando o desempenho global do sistema analítico, o qual reflete a contribuição de todas as etapas.

Dois documentos que definem procedimentos para a estimativa da incerteza recorrendo a este tipo de estratégia são a ISO 11352:2012 (“*Water quality – Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*”) (ISO 2012) e o guia da NORDTEST (Magnusson *et al.* 2004). A metodologia para o cálculo da incerteza apresentada no guia da NORDTEST e na ISO 11352:2012 fundamentam-se nos mesmos princípios (e fórmulas de cálculo); em ambos os casos, são estimadas duas componentes de incerteza, uma associada à precisão e a outra à justeza, que são combinadas para obter uma estimativa da incerteza global.

Considerando as vantagens e desvantagens associadas a cada forma de estimativa da incerteza, e tendo em conta que o sistema analítico avaliado neste trabalho é complexo, na medida em que envolve várias etapas, optou-se por adotar a estratégia de estimativa da incerteza apresentada na norma ISO 11352:2012. Embora esta norma se foque na análise de águas, a estratégia de cálculo de incerteza aí apresentada é aplicável a outras matrizes, tal como se reflete no guia da NORDTEST, onde é apresentado um exemplo de aplicação desse tipo de abordagem na análise de sedimentos.

A norma ISO 11352:2012 apresenta duas alternativas para a estimativa da incerteza recorrendo aos dados de validação e controlo de qualidade. Uma dessas estratégias envolve o uso de MRC, enquanto a outra implica a participação em Estudos de Comparação Interlaboratorial (ECI). Como neste trabalho não ocorreu a participação em qualquer ECI de análise de elementos químicos em cabelo, recorreu-se à estratégia de estimativa de incerteza que envolve o uso de MRC. De seguida, são apresentadas as fórmulas matemáticas consideradas na avaliação da incerteza, recorrendo a este tipo de abordagem.

A componente de incerteza associada à precisão ( $u_{Rw}$ ), expressa na forma de incerteza-padrão relativa, é calculada recorrendo ao cálculo do coeficiente de variação (desvio-padrão relativo) das determinações experimentais da concentração no MRC em condições de precisão intermédia, de acordo com a seguinte fórmula:

$$u_{Rw} = \frac{S_{Rw}}{C_{MRC,experimental}}$$

Equação 57

em que:

$s_{Rw}$  (µg/g) – Desvio-padrão obtido de determinações repetidas, em condições de precisão intermédia, do valor de concentração no MRC;

$C_{MRC,experimental}$  (µg/g) – Concentração média obtida na análise repetida do MRC em condições de precisão intermédia.

A componente de incerteza associada à veracidade ( $u_b$ ) é calculada recorrendo às seguintes fórmulas matemáticas:

$$u_{cref} = \frac{U_{MRC}/k}{C_{MRC,certificado}}$$

Equação 58

$$u_b = \sqrt{b^2 + \left[ \frac{u_{RW}}{\sqrt{n_M}} \right]^2 + u_{cref}^2}$$

Equação 59

em que:

$u_{cref}$  (µg/g) – Incerteza-padrão relativa da concentração indicada no certificado de análise do MRC;

$U_{MRC}$  (µg/g) – Incerteza expandida da concentração indicada no certificado de análise do MRC;

$k$  – Fator de expansão referido no certificado de análise do MRC;

$C_{MRC,certificado}$  (µg/g) – Concentração indicada no certificado de análise do MRC;

$b$  (µg/g) – Erro relativo associado às leituras do MRC (diferença entre o valor médio obtido para a concentração e o valor que consta no certificado de análise do MRC – *bias*)

$u_{RW}$  (µg/g) – Incerteza-padrão (desvio-padrão) associada às medições experimentais no MRC

$n_M$  – Número de leituras medições da concentração no MRC.

A incerteza-padrão combinada (relativa) ( $u_c$ ), é calculada com a seguinte equação:

$$u_c = \sqrt{u_b^2 + u_{RW}^2}$$

Equação 60

Por fim, para expressar a incerteza na forma de intervalo de confiança (incerteza-expandida –  $U$ ) a incerteza-padrão é multiplicada por um fator de expansão  $k = 2$ , que corresponde a um nível de confiança de  $\approx 95\%$ .

O intervalo definido pela incerteza expandida calculada deverá conter o valor verdadeiro de concentração, assumindo-se como valor verdadeiro aquele que consta no certificado de análise do MRC. Quando tal não acontecesse, este intervalo poderá estar

subestimado. Nestes casos, é geralmente empregue o conceito de erro normalizado ( $E_n$ ) para efetuar a avaliação do desempenho, recorrendo à seguinte equação (RELACRE 2000):

$$E_n = \frac{C_{MRC,experimental} - C_{MRC,certificado}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{MRC}^2}}$$

Equação 61

em que:

$U_{lab}$  (µg/g) – Incerteza expandida associada à medição no laboratório

(Os restantes símbolos estão de acordo com a nomenclatura referida anteriormente.)

Se  $-1 \leq E_n \leq 1$ , então conclui-se que a incerteza está bem estimada, pois existe a sobreposição dos intervalos definidos pela incerteza associada ao valor de concentração obtido experimentalmente e pela incerteza associada à concentração certificada.

Embora o erro normalizado seja usado frequentemente na avaliação da incerteza calculada, devido à sua simplicidade, é mais correto, do ponto de vista estatístico, realizar um teste  $t$ , em que é calculado um fator  $t$  recorrendo a uma equação análoga à do erro normalizado, mas em que as incertezas expandidas são substituídas pelas incertezas-padrão. O fator  $t$  calculado é comparado com o valor de  $t$  tabelado (crítico), considerando a distribuição de  $t$  de *Student* correspondente ao número de graus de liberdade associado ao número de medições realizadas para estimar a incerteza. Se o valor de  $t$  calculado for inferior ao valor de  $t$  tabelado, então pode concluir-se que a incerteza foi bem estimada. Para a avaliação da incerteza calculada neste trabalho, recorreu-se às duas estratégias referidas.

De notar que a incerteza é uma propriedade do resultado de uma medida obtida com determinado sistema analítico e não uma característica de desempenho desse sistema. Apesar disso, a incerteza obtida depende das características de desempenho do sistema analítico, sendo que, idealmente, a sua grandeza deverá refletir todas as fontes de erro. Assim, se for definida uma determinada incerteza máxima por um cliente ou por legislação, por exemplo, os requisitos definidos para as várias características de desempenho do sistema analítico terão de ser ajustados, para que a incerteza resultante cumpra o critério estabelecido. Portanto, a incerteza pode influenciar a definição dos critérios usados na avaliação das características de desempenho do sistema analítico para a validação (Gašljević 2010). Neste contexto, os critérios que definem os requisitos de desempenho do sistema analítico avaliado neste trabalho foram ajustados de forma a refletirem o comportamento observado para o sistema analítico (cartas de controlo) e a incerteza estimada para as respetivas medições realizadas.





## **4. Apresentação e discussão de resultados**



#### 4.1. Desenvolvimento do sistema analítico de quantificação multielementar em cabelo humano por ICP-MS

O trabalho de laboratório iniciou-se com a realização de um conjunto de ensaios que teve como objetivo global o estudo e desenvolvimento do sistema analítico a aplicar na quantificação de vários elementos em cabelo por ICP-MS. Num primeiro conjunto de ensaios, optou-se por usar apenas materiais de referência certificados (MRC) de cabelo. Como os MRC são amostras muito bem caracterizadas, isso permite ter um maior controlo na avaliação do desempenho do sistema analítico. Na **Tabela 44** (Anexos), são indicadas as concentrações dos vários elementos nos dois MRC de cabelo usados (ERM DB001 e GBW 09101b).

O objetivo global referido pode ser dividido no seguinte conjunto de tarefas:

- Preparar as amostras de MRC de cabelo para digestão;
- Digerir o MRC de cabelo em meio ácido e por micro-ondas;
- Analisar por ICP-MS as amostras de MRC de cabelo digeridas e conhecer as limitações analíticas do equipamento existente no LCA, considerando as concentrações dos vários elementos presentes nas amostras de MRC de cabelo;
- Identificar os elementos a incluir no âmbito da validação, em função dos resultados obtidos.

O trabalho desenvolvido no âmbito deste Estágio centrou-se nas etapas de digestão e de quantificação, que foram também as etapas estudadas nestes primeiros ensaios.

##### 4.1.1. Secagem e determinação da humidade nos MRC de cabelo

Na **Tabela 19**, são apresentados os resultados obtidos na determinação da humidade, para cada um dos MRC de cabelo usados neste trabalho, com o método gravimétrico descrito anteriormente. A massa de MRC usada nas várias determinações da humidade foi aproximadamente a mesma das porções não secas digeridas independentemente, como recomendado nas instruções de utilização dos MRC (**Tabela 5**).

**Tabela 19** – Humidade dos MRC de cabelo usados neste trabalho

Designação	MRC	Temperatura de secagem (°C)	Humidade (%)
A1'	ERM DB001	105	7,9
A2'			5,1
A3'			9,0
A4'	GBW 09101b	85	4,7
A5'	ERM DB001	105	1,3
A6'	GBW 09101b		2,6

Verifica-se na **Tabela 19** que a percentagem de humidade variou entre 1,3% e 9,0%. O critério indicado nas instruções de utilização do ERM DB001 (**Tabela 5**) para definir a sua secagem completa é a obtenção de uma diferença de massas, entre determinações sucessivas após secagem na estufa, não superior a 0,2 mg, considerando uma massa inicial de aproximadamente 200 mg (variação inferior a 0,1%). Nas três primeiras secagens de MRC de cabelo, não foi possível cumprir o critério referido, verificando-se flutuações nas massas determinadas. Estas flutuações deveram-se provavelmente ao exsicador usado, pois este não se encontrava nas devidas condições, tendo-se verificado que a zona entre a tampa e a base não estava devidamente vedada. Assim, o material colocado no referido exsicador absorvia humidade. Para além disso, os contentores utilizados para colocar as porções de MRC na estufa para a determinação da humidade eram de *teflon*, um material que se caracteriza por uma baixa capacidade de absorção de água (<0,01%) (Hung *et al.* 1996). Contudo, os recipientes utilizados tinham cerca de 25 g, e considerando a baixa massa da porção pesada ( $\approx 50$  mg), a contribuição da humidade contida no recipiente pode atingir os 2,5 mg (0,01% de 25000 mg), o que se traduz num possível erro na determinação da percentagem de humidade da amostra de 5%. Assim, parte da perda de massa poderá ser explicada não pela perda de humidade da porção de MRC, mas sim devido à perda da humidade do recipiente.

De facto, as percentagens de humidade calculadas para as três primeiras porções secas (A1', A2' e A3') são superiores aos valores reportados no relatório de certificação do MRC (0,3% a 4,7%) [20]. Apesar disso, foram obtidos resultados com uma exatidão satisfatória na análise dos elementos químicos das porções não secas, o que é indicativo de que a correção da contribuição da humidade para a massa total terá sido adequada.

Após este primeiro conjunto de secagens, verificou-se que a percentagem de humidade no cabelo era inferior a 10%, e, por isso, optou-se por passar a armazenar os MRC num exsicador e deixar de proceder à secagem do material para proceder ao cálculo da humidade, assumindo que, por estar armazenado em condições adequadas, o material se encontrava praticamente seco. Este tipo de abordagem, embora não seja a recomendada, permite uma maior economia dos MRC, o que é um aspeto bastante importante, tendo em conta que estes materiais são muito caros. Os últimos dois resultados apresentados na **Tabela 19** correspondem à avaliação da humidade em ambos os MRC após o armazenamento dos materiais no exsicador, tendo sido obtidos valores para a humidade no cabelo inferiores a

3%. As porções dos MRC digeridas subsequentemente à secagem, e para as quais não foi realizada qualquer correção de humidade, resultaram na obtenção de uma exatidão satisfatória na quantificação da maioria dos elementos. Assim, pode-se concluir que a contribuição da humidade para a massa total é pouco significativa, desde que o material seja armazenado no exsicador.

#### 4.1.2. Definição dos elementos a quantificar

Na **Tabela 20**, são indicados os elementos com concentrações de referência (valores certificados ou informativos) nos MRC de cabelo usados para os quais foram obtidas funções de calibração neste trabalho. Os símbolos “€” e “¥” identificam cada um dos MRC de cabelo, respetivamente ERM DB001 e GBW 09101b, com concentrações de referência para cada um dos elementos indicados.

Para a maioria dos elementos, incluindo os que foram selecionados posteriormente para a validação (Cu, Zn e Pb), foram obtidas sempre funções de calibração definidas por pelo menos 5 pontos (padrões), mas para alguns elementos isso não se verificou. Nesses casos, a função de calibração não foi rejeitada, desde que se verificasse a obtenção de um erro de justeza reduzido, considerando os critérios definidos anteriormente.

**Tabela 20 – Identificação dos elementos quantificáveis com valores de referência das concentrações para os MRC**

Elemento	C <sub>ref</sub> (µg/g)		Elemento	C <sub>ref</sub> (µg/g)	
	ERM (€)	GBW (¥)		ERM (€)	GBW (¥)
<sup>9</sup> Be (€)	0,0029		<sup>75</sup> As (€ ¥)	0,044	0,198
<sup>11</sup> B (€)	3,1		<sup>82</sup> Se (€ ¥)	3,24	0,59
<sup>23</sup> Na (¥)		445	<sup>88</sup> Sr (¥)		8,17
<sup>24</sup> Mg (¥)	63,5	248	<sup>90</sup> Zr (€)	0,064	
<sup>27</sup> Al (¥)	18,1	23,2	<sup>93</sup> Nb (€)	0,0036	
<sup>31</sup> P (¥)	142,2	174	<sup>95</sup> Mo (¥)	0,2	1,06
<sup>39</sup> K (¥)		14,4	<sup>109</sup> Ag (¥)	0,39	0,037
<sup>44</sup> Ca (¥)	1028	1537	<sup>111</sup> Cd (€ ¥)	0,125	0,072
<sup>47</sup> Ti (¥)	109	2,1	<sup>118</sup> Sn (€)	0,44	
<sup>51</sup> V (€ ¥)	0,0493	0,089	<sup>121</sup> Sb (¥)	0,128	0,12
<sup>52</sup> Cr (¥)	0,5	8,74	<sup>133</sup> Cs (€)	0,0012	
<sup>55</sup> Mn (¥)	0,442	3,83	<sup>137</sup> Ba (¥)	0,9	11,1
<sup>56</sup> Fe (¥)	22,6	160	<sup>139</sup> La (¥)		0,029
<sup>59</sup> Co (¥)	0,106	0,153	<sup>178</sup> Hf (€)	0,00207	
<sup>60</sup> Ni (€ ¥)	0,78	5,77	<sup>205</sup> Tl (€)	0,00048	
<sup>65</sup> Cu (€ ¥)	33	33,6	<sup>208</sup> Pb (€ ¥)	2,14	3,83
<sup>66</sup> Zn (€ ¥)	209	191	<sup>238</sup> U (€)	0,0101	

A quantificação dos elementos com concentração de referência sombreada a vermelho na **Tabela 20** é realizada numa zona de concentração na qual o desempenho da quantificação é afetado, devido às limitações da técnica em termos de sensibilidade, o que

se reflete numa exatidão insatisfatória. Assim, os elementos cuja concentração está sombreada a verde foram incluídos no estudo preliminar do desempenho do sistema analítico, enquanto os assinalados a vermelho não foram incluídos nesse estudo, devido à sensibilidade insuficiente do equipamento de ICP-MS utilizado.

#### 4.1.3. Avaliação do procedimento de digestão e análise de cabelo

Para avaliar o procedimento de digestão, foram digeridas várias porções de MRC de cabelo, que foram analisadas por ICP-MS em vários dias. Na **Figura 45** e na **Figura 46** são representados, respetivamente, para os MRC ERM DB001 e MRC GBW 09101b, os valores das recuperações médias e dos respetivos intervalos de confiança (barras de erro a preto). As barras de erro a azul e a tracejado representam os limites definidos pelo desvio-padrão dos resultados considerados no cálculo da recuperação média. As linhas tracejadas amarelas e vermelhas representam, respetivamente, desvios de  $\pm 10\%$  e  $\pm 20\%$  relativamente ao valor ideal de recuperação de 100% (linha verde, a cheio). As linhas a cheio amarela e vermelha representam, respetivamente, as recuperações correspondentes a valores de *z-score* de  $\pm 2$  e  $\pm 3$  (apenas para os elementos certificados). Os intervalos de confiança (IC) foram calculados recorrendo à seguinte equação (Miller *et al.* 2010):

$$IC = \pm t_{n-1,95\%} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Equação 62

em que:

$t_{n-1,95\%}$  – Parâmetro da distribuição *t* de *Student* para um nível de confiança de 95% e  $n-1$  graus de liberdade;

$s$  (%) – Desvio-padrão associado a cada uma das recuperações médias calculadas;

$n$  – Número de valores de recuperação considerados para o cálculo das recuperações médias.

Da análise da **Figura 45** e da **Figura 46**, pode-se concluir que a maioria dos resultados encontram-se entre os limites definidos pelo intervalo de recuperação  $100 \pm 20\%$ , cumprindo, portanto, o requisito inicial de erro de justeza definido.

A análise da **Figura 45** permite verificar que para todos os elementos com concentração certificada no MRC ERM DB001 são obtidos valores médios de recuperação que se encontram dentro dos limites definidos pelas linhas do *z-score*. Comparativamente aos elementos com valores informativos para a concentração de referência, os elementos com valores certificados de concentração revelam menores desvios à recuperação de 100% e uma menor dispersão dos pontos. O Se (selénio) constitui uma exceção a essa observação,

tendo-se verificado vários problemas na quantificação deste elemento nas várias análises por ICP-MS. Alguns elementos revelam valores elevados de recuperação, maioritariamente no MRC ERM DB001, o que é indicativo de possíveis contaminações, nomeadamente de Al, Ti, Cr, Mn e Ni. Essas contaminações podem ser devidas à deposição de poeiras contendo esses elementos ou aos vasos de digestão, devido a uma lavagem desadequada.

Para alguns elementos com concentração não certificadas, nomeadamente Mg, Ca, Co, Ag, Sn e Ba, são obtidos valores médios de recuperação próximos de 100%. Para Mg, Ca, Co e Ba, essa observação está de acordo com o que se verifica na análise do MRC GBW 09101b (**Figura 46**). Portanto, pode-se concluir que o sistema analítico proporciona uma exatidão satisfatória na quantificação desses elementos no cabelo. As recuperações médias obtidas na análise de Ag e Sn devem ser interpretadas com cuidado, pois, embora estejam próximas do valor ideal de 100%, foram calculadas com base num conjunto reduzido de análises, devido às limitações instrumentais em termos de LQ para esses elementos. Os elementos para os quais se verificam maiores desvios à recuperação de 100% são B, Al, Cr, Mn e Fe. De notar, contudo, que as concentrações indicadas para esses elementos MRC ERM DB001 são valores informativos (sem estimativa da incerteza associada). Uma possível explicação para os desvios obtidos, são as reduzidas concentrações desses elementos no MRC ERM DB001, nomeadamente Cr, Mn e Fe. As concentrações de referência desses elementos no MRC ERM DB001 são consideravelmente inferiores ao que se verifica para o MRC GBW 09101b, sendo que para este último MRC o sistema analítico demonstrou uma exatidão satisfatória na quantificação dos elementos referidos

A análise da **Figura 46** permite verificar que, para o MRC GBW 09101b, quase todos os valores médios de recuperação estão contidos entre as linhas definidas pelos valores indicados de *z-score* e que as barras de erro correspondentes ao intervalo de confiança da recuperação média, intercetam a linha definida pelo valor ideal de 100%. Para os elementos com concentração de referência não certificada (Ti e Ni), a recuperação média está próxima de 100% e os respetivos intervalos de confiança não excedem 15%. Assim, pode-se concluir que as análises realizadas corroboram a validade dos valores de referência (informativos) para a concentração desses elementos no MRC GBW 09101b. Os maiores desvios ao valor de recuperação ideal de 100% foram obtidos na análise de P e Pb. Para o P, foi obtida uma recuperação média de aproximadamente 82%, valor que é consideravelmente inferior a 100%, contudo esse valor encontra-se dentro dos intervalos definidos pelo *z-score*. O Pb é o

único elemento para o qual se verificou na análise do MRC GBW 09101b a obtenção uma recuperação média que excede o limite de  $z\text{-score} = 3$ ; contudo, considerando a análise desse elemento no MRC ERM DB001 (**Figura 45**), é obtido um valor médio de recuperação de aproximadamente 102%, o qual se encontra dentro dos limites definidos pelas linhas do  $z\text{-score}$ , e a recuperação ideal de 100% está incluída no respetivo intervalo de confiança.

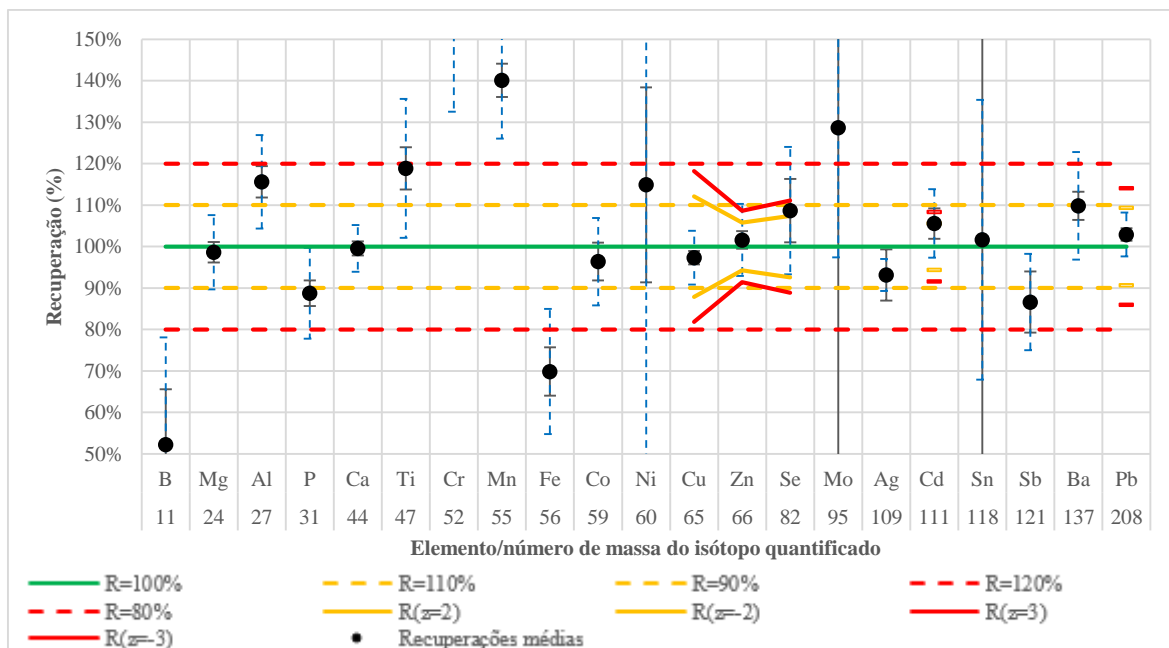


Figura 45 – Recuperações médias (pontos) e respetivos desvios-padrão (barras de erro a azul e a tracejado) e intervalos de confiança (barras de erro a preto) na análise por ICP-MS, em vários dias, de soluções do MRC ERM DB001 digerido

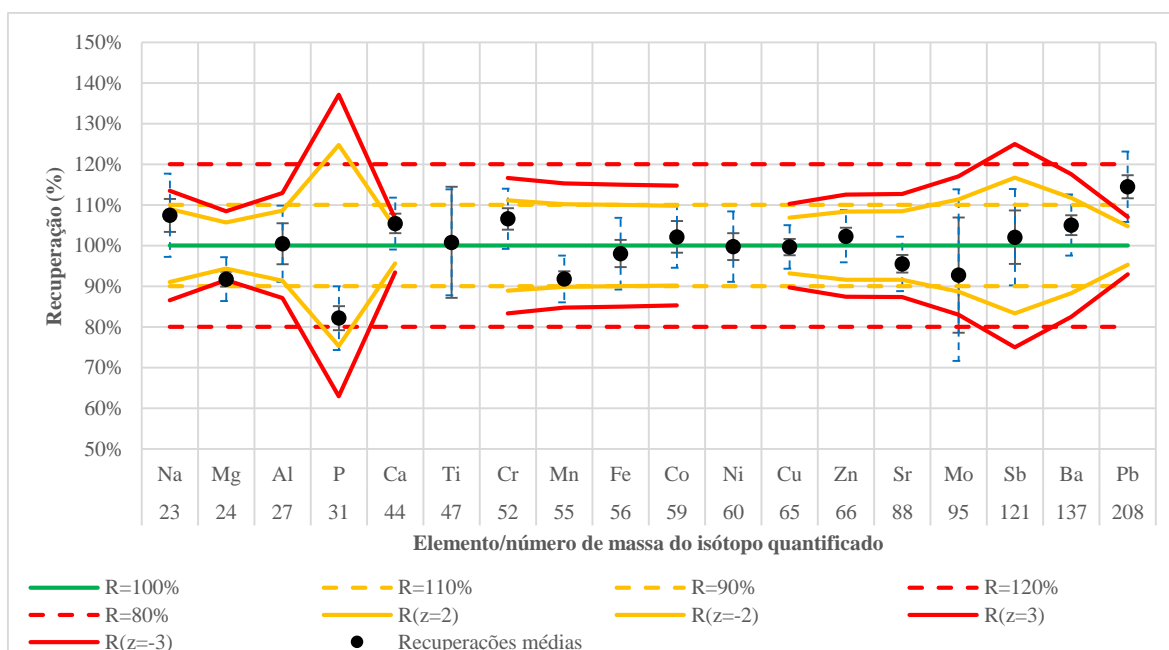


Figura 46 – Recuperações médias (pontos) e respetivos desvios-padrão (barras de erro a azul e a tracejado) e intervalos de confiança (barras de erro a preto) na análise por ICP-MS, em vários dias, de soluções do MRC GBW 09101b digerido



Em suma, conclui-se, com base nos resultados obtidos na análise dos MRC de cabelo, que para os 18 elementos com concentrações certificadas, o sistema analítico revelou uma exatidão global satisfatória. Constituem exceções a esta observação a quantificação de Pb no MRC GBW 09101b, na qual foi obtida um desempenho global insatisfatório ( $z\text{-score}>3$ ) e a quantificação de Se no MRC ERM DB001, na qual foi obtida um desempenho questionável ( $2<z\text{-score}<3$ ).

Na **Tabela 21**, são apresentados os resultados da análise por ICP-MS de todos os brancos de digestão obtidos no contexto deste trabalho. Nos casos em que as mesmas soluções de branco foram analisadas em mais de um dia, são apresentadas as médias das concentrações determinadas. Os valores de LD instrumental apresentados correspondem a 1/3 dos valores máximos de LQ obtidos nos vários dias de análise por ICP-MS. As concentrações indicadas na **Tabela 21** para os vários brancos de digestão são comparadas com os valores indicados para o LD, sendo que o sombreado vermelho destaca as concentrações que, em módulo, são superiores a esse limite.

Tendo em conta os critérios definidos, verifica-se na **Tabela 21** que para B, Na, Mg, Al, Ti, Ni, Mo, Ag, Sn, Ba e Pb as concentrações calculadas em alguns brancos de digestão são superiores ao valor do LD. Portanto, estes elementos são aqueles que aparentemente são mais suscetíveis a problemas de contaminação.

Para avaliar a influência das contaminações referidas no contexto da análise de cabelo, na **Figura 47** e na **Figura 48** são apresentados gráficos de dispersão, em que são representadas as razões entre as concentrações calculadas para todos os brancos de digestão (**Tabela 21**) e as concentrações de referência para os vários elementos analisados em cada um dos MRC. Esses gráficos demonstram que a análise ao MRC GBW 09101b é, para a maioria dos elementos, menos afetada pelas contaminações, relativamente ao que se verifica para o MRC ERM DB001. Como a concentração da maioria dos elementos mais suscetíveis a contaminações é maior no MRC GBW 09101b, a influência das contaminações na percentagem de recuperação calculada será menor comparativamente ao que se verifica para o MRC ERM DB001. Essa constatação é uma possível explicação para terem sido obtidos desvios maiores nas médias de recuperação calculadas para vários elementos no MRC ERM DB001 (**Figura 45**), comparativamente ao que se verificou para o MRC GBW 09101b (**Figura 46**).

Tabela 21 – Concentração de vários elementos nas soluções de branco de digestão (comparação com o valor máximo do LD)

Elementos/Isótopos⇒		<sup>11</sup> B (€)	<sup>23</sup> Na (¥)	<sup>24</sup> Mg (¥)	<sup>27</sup> Al (¥)	<sup>31</sup> P (¥)	<sup>44</sup> Ca (¥)	<sup>47</sup> Ti (¥)	<sup>52</sup> Cr (¥)	<sup>55</sup> Mn (¥)	<sup>56</sup> Fe (¥)	<sup>59</sup> Co (¥)	<sup>60</sup> Ni (€ ¥)
LD (µg/L)⇒		1,7E+00	1,3E+02	1,7E+01	3,3E+00	8,3E+01	8,3E+01	6,7E-01	3,3E-01	3,3E-01	1,7E+02	6,7E-01	1,0E+00
Digestão	Solução	Valores obtidos para a concentração nas soluções de branco de digestão (µg/L)											
1	B1	1,5E+00	-1,1E+01	1,4E+01	1,3E+01	-1,2E+01	1,5E+01	3,1E-01	3,3E-02	3,5E-02	-2,2E+00	4,9E-02	2,2E-02
2	B2	8,9E-01	-6,0E+00	9,1E-01	7,2E-01	-1,4E+01	1,0E+01	6,5E-01	3,5E-02	-9,0E-03	-8,6E+00	2,3E-02	2,4E+00
3	B3	3,8E-01	2,7E+01	6,7E+00	5,1E+00	-1,1E+01	1,7E+01	7,2E-01	-2,0E-02	-1,1E-02	-8,5E+00	2,0E-02	-1,0E-02
4	B4	-4,5E-01	-2,7E+01	1,0E-01	5,0E-01	-5,0E+00	1,6E+01	4,0E-02	-2,5E-02	-4,0E-03	1,8E+00	-2,7E-03	-5,6E-03
4	B5	-6,0E-01	-2,8E+01	-3,8E-01	-8,7E-01	-6,3E+00	-5,5E+00	-1,6E-02	-3,8E-02	-7,9E-03	1,6E-01	-4,1E-03	-5,5E-02
5	B6	1,6E+01	4,3E+01	3,1E+01	3,9E+01	-7,6E+00	4,9E+01	4,1E-01	-4,3E-02	1,8E-01	-4,7E+00	3,6E-03	6,5E-01
5	B7	1,1E+00	8,0E+00	-3,9E-01	9,8E-01	-3,3E+00	-1,2E+01	2,1E-02	-1,5E-03	-1,3E-02	2,2E+00	-1,5E-03	6,2E-02
6	B8	2,5E+00	-8,2E+00	7,8E+00	6,3E+01	-7,8E+00	1,8E+01	2,1E-01	6,8E-03	6,7E-02	-4,4E+00	-5,0E-04	-5,6E-02
6	B9	1,4E+00	-5,5E+00	1,5E+00	-4,4E-01	-9,4E+00	-1,4E+01	-2,4E-03	2,1E-02	-1,4E-02	6,9E+00	-2,5E-03	-5,7E-02
7	B10	1,4E-01	-1,3E+01	-1,7E-01	5,7E-01	-2,7E+00	2,1E+00	9,8E-03	1,7E-04	-4,7E-03	8,3E-01	-3,3E-03	2,7E-01
7	B11	8,3E-02	-1,5E+01	-3,7E-01	5,2E-01	-2,8E+00	-5,4E+00	-2,3E-03	-1,9E-02	-3,0E-03	1,4E+00	-3,7E-03	8,0E-01
7	B12	1,3E-01	-4,3E+00	-2,7E-01	2,8E+00	-2,2E+00	2,7E-01	9,4E-02	-1,3E-02	-1,7E-03	1,2E+00	6,7E-04	5,5E-01
8	B13		1,2E+02	6,9E-02	4,4E-01	-3,5E-01	3,9E+01	2,7E-02	1,4E-02	3,8E-02	-1,0E+01	-2,0E-03	1,9E+00
8	B14		1,3E+02	-4,6E-01	-2,9E-01	2,0E-02	-3,8E+00	9,0E-02	1,3E-02	-2,5E-03	-1,0E+01	5,0E-04	4,5E-01
9	B15		1,1E+02	-8,6E-01	-1,0E+00	-2,1E+00	-1,7E+01	1,3E-02	-7,0E-02	-5,5E-03	-1,6E+01	0,0E+00	1,7E-01
9	B16		1,0E+02	-9,0E-01	-1,5E+00	-1,5E+00	-1,4E+01	-4,9E-02	-6,8E-02	-4,0E-03	-1,5E+01	-5,0E-04	2,3E-01
10	B17		1,1E+02	-7,5E-01	-4,5E-01	-2,5E+00	-1,6E+01	0,0E+00	-7,6E-02	-1,5E-02	-1,5E+01	1,0E-03	4,6E-01
10	B18		1,3E+02	4,0E+00	5,2E+00	-8,6E-02	-1,8E+00	3,1E-02	-5,5E-02	8,0E-03	-1,4E+01	6,5E-03	7,0E-01
11	B19		-2,0E+00	5,4E-01	2,3E+00	-4,1E+00	9,9E-01	2,5E-01	3,0E-03	-1,0E-02	-9,2E+00	-2,0E-03	4,0E-03
11	B20		-2,7E+00	6,9E-02	6,8E-01	-1,5E+00	2,3E+00	6,4E-02	6,0E-03	-1,2E-02	-7,5E+00	-2,0E-03	1,1E-01
12	B21		-7,6E+01	2,3E-01	1,9E+00	3,5E+00	1,4E+01	2,9E-01	8,1E-02	-1,7E-02	-6,4E+00	-2,7E-02	-3,0E-01
12	B22		-1,3E+02	-2,5E-01	1,4E+00	2,9E+00	-7,8E+00	1,3E-01	2,7E-02	-2,7E-02	-8,0E+00	-2,2E-02	-8,0E-01
13	B23		5,3E+00	1,1E+00	3,2E+00	-2,2E-01	3,5E+00	3,2E-01	1,1E-01	8,0E-03	-8,4E+00	-1,0E-03	4,4E-02
13	B24		3,8E+00	8,0E-02	5,6E-01	-6,7E-01	3,6E+00	1,2E-01	1,2E-01	6,0E-03	-7,8E+00	-1,0E-03	9,7E-02
14	B25		-3,2E+02	3,4E-01	6,9E+00	3,9E+00	7,3E+00	3,2E-02	1,4E-01	-4,1E-02	-3,8E+00	2,0E-03	-1,7E+00
14	B26		-3,8E+02	-3,4E-01	4,8E+00	1,4E+00	-8,1E+00	2,8E-02	-2,7E-02	-3,7E-02	-5,7E+00	6,0E-03	6,1E-01
14	B27		-4,4E+02	-2,0E-01	4,7E+00	3,0E+00	-1,9E+01	5,0E-03	-2,6E-02	-5,3E-02	-7,5E+00	-1,4E-02	-2,2E+00
15	B28		-9,6E+01	7,3E-01	2,5E+00	2,2E+00	1,2E+01	-1,0E-03	-3,2E-02	-2,4E-02	-2,5E+00	-1,2E-02	-4,3E-01
15	B29		-9,9E+01	-1,9E-01	1,4E+00	2,2E+00	2,0E+00	3,0E-02	-3,4E-02	-2,7E-02	-2,7E+00	-1,1E-02	-8,3E-01

Tabela 21 (continuação) – Concentração de vários elementos nas soluções de branco de digestão (comparação com o valor máximo do LD)

Elementos/Isótopos⇒		<sup>65</sup> Cu (€ ¥)	<sup>66</sup> Zn (€ ¥)	<sup>82</sup> Se (€ ¥)	<sup>88</sup> Sr (¥)	<sup>95</sup> Mo (¥)	<sup>109</sup> Ag (¥)	<sup>111</sup> Cd (€ ¥)	<sup>118</sup> Sn (€)	<sup>121</sup> Sb (¥)	<sup>137</sup> Ba (¥)	<sup>208</sup> Pb (€ ¥)
LD (µg/L)⇒		1,7E+00	1,7E+01	3,3E+00	3,3E-01	6,7E-01	6,7E-01	3,3E-01	1,7E+00	1,7E-01	3,3E-01	3,3E-01
Digestão	Solução	Valores calculados para a concentração nas soluções de branco de digestão (µg/L)										
1	B1	1,4E+00	1,4E+00	5,4E-01	1,7E-01	9,4E-01	2,3E+00	7,0E-03	3,9E+00	2,4E-02	1,3E-01	8,1E-02
2	B2	<u>-5,1E-01</u>	9,0E-01	3,4E-01	5,3E-02	5,8E-01	1,5E+01	8,0E-04	4,3E+00	1,7E-02	3,5E-02	<u>-3,3E-03</u>
3	B3	<u>-5,4E-01</u>	9,1E-01	3,6E-01	3,9E-02	3,9E-01	1,6E+00	7,2E-03	3,7E+00	1,6E-02	1,8E-01	3,0E-02
4	B4	<u>-3,4E-01</u>	2,0E-01	2,1E-01	<u>-1,3E-02</u>	4,3E-01	3,5E-01	1,3E-03	2,7E-01	4,8E-03	<u>-1,7E-02</u>	<u>-4,7E-02</u>
4	B5	<u>-3,5E-01</u>	<u>-1,9E-01</u>	1,2E-01	<u>-2,2E-02</u>	2,9E-01	<u>-1,5E-01</u>	0,0E+00	1,2E-01	0,0E+00	<u>-4,0E-02</u>	<u>-5,0E-02</u>
5	B6	<u>-5,3E-01</u>	<u>-7,6E-01</u>	<u>-1,6E-01</u>	3,0E-01	1,7E-01	<u>-3,2E-01</u>	4,6E-03	1,2E+00	5,6E-03	4,9E+00	3,1E-02
5	B7	<u>-4,2E-01</u>	2,5E-01	1,8E-02	<u>-1,7E-04</u>	1,3E+00	<u>-1,8E-02</u>	1,7E-03	<u>-7,6E-03</u>	1,8E-03	4,7E-02	<u>-2,4E-02</u>
6	B8	<u>-4,1E-01</u>	<u>-4,0E-01</u>	<u>-5,2E-02</u>	6,1E-02	1,2E+00	7,7E+01	5,2E-03	1,2E+00	3,3E-04	3,0E-01	<u>-1,6E-02</u>
6	B9	<u>-4,8E-01</u>	1,2E+00	5,7E-02	<u>-9,7E-03</u>	4,0E-01	8,1E-01	1,8E-03	<u>-2,7E-01</u>	<u>-5,8E-03</u>	5,2E-01	<u>-3,3E-02</u>
7	B10	<u>-1,4E-01</u>	1,6E+00	<u>-8,5E-02</u>	4,0E-03	4,9E-01	3,2E-01	6,7E-04	<u>-1,7E-01</u>	<u>-5,8E-03</u>	<u>-5,7E-03</u>	<u>-1,9E-02</u>
7	B11	<u>-1,6E-01</u>	1,6E+00	<u>-1,6E-01</u>	4,8E-03	3,2E-01	2,8E-01	1,0E-03	<u>-1,8E-01</u>	<u>-7,2E-03</u>	7,6E-02	<u>-2,2E-02</u>
7	B12	<u>-1,4E-01</u>	2,5E+00	<u>-1,3E-01</u>	2,4E-02	2,5E-01	1,1E-01	2,5E-03	<u>-2,1E-01</u>	<u>-8,7E-03</u>	1,7E-02	<u>-2,8E-02</u>
8	B13	8,8E-02	3,8E+00	7,0E-02	<u>-3,0E-03</u>		9,2E-02	<u>-1,3E-02</u>	9,6E-02	<u>-6,0E-03</u>	3,0E-02	1,4E-02
8	B14	4,1E-01	7,0E-01	<u>-4,0E-02</u>	<u>-3,2E-02</u>		9,7E-02	<u>-1,5E-02</u>	9,7E-02	<u>-8,0E-03</u>	3,7E-02	2,0E-02
9	B15	5,7E-02	3,3E-01	<u>-2,7E-02</u>	<u>-4,2E-02</u>		1,5E-01	<u>-1,8E-02</u>	9,1E-01	<u>-9,5E-03</u>	2,8E-02	5,9E-02
9	B16	<u>-6,8E-02</u>	<u>-1,2E-01</u>	<u>-4,8E-02</u>	<u>-4,5E-02</u>		1,6E-02	<u>-1,7E-02</u>	1,5E-01	<u>-1,0E-02</u>	5,5E-03	<u>-8,5E-03</u>
10	B17	<u>-2,6E-02</u>	<u>-9,8E-02</u>	<u>-5,9E-02</u>	<u>-3,2E-02</u>		5,0E-02	<u>-1,6E-02</u>	1,8E-01	<u>-1,1E-02</u>	1,1E-02	<u>-3,6E-02</u>
10	B18	6,7E-02	8,1E-01	<u>-2,8E-02</u>	<u>-1,9E-02</u>		9,7E-02	<u>-5,0E-04</u>	1,8E-01	<u>-8,0E-03</u>	1,1E+00	4,8E-01
11	B19	7,0E-03	2,9E-01	2,1E-01	8,0E-03		1,4E-01	<u>-1,8E-02</u>	3,7E-01	<u>-1,0E-03</u>	7,1E-02	5,0E-02
11	B20	<u>-5,1E-02</u>	8,8E-01	1,4E-01	6,0E-03		4,8E-02	<u>-1,8E-02</u>	2,6E-01	<u>-7,0E-03</u>	<u>-2,0E-03</u>	2,0E-03
12	B21	<u>-1,9E-01</u>	1,5E+00	1,0E-01	4,5E-02	1,3E-01	2,2E-02	<u>-2,5E-03</u>	4,7E-01	4,5E-03	3,6E-02	4,9E-02
12	B22	<u>-3,7E-01</u>	6,9E-01	8,0E-02	3,0E-02	1,3E-01	5,0E-02	<u>-2,0E-03</u>	3,2E-01	4,5E-03	<u>-7,5E-03</u>	3,2E-02
13	B23	1,3E-02	4,2E-01	2,1E-01	1,1E-01	1,5E-01	9,2E-02	0,0E+00	2,8E-01	2,0E-03	1,7E-01	9,1E-02
13	B24	<u>-3,4E-02</u>	1,0E+00	2,4E-01	9,9E-02	1,2E-01	<u>-1,4E-02</u>	0,0E+00	1,9E-01	<u>-1,0E-03</u>	<u>-9,0E-03</u>	6,0E-03
14	B25	<u>-6,8E-01</u>	8,8E-01	3,0E-01	<u>-3,5E-02</u>		4,9E-02	<u>-5,0E-03</u>	3,2E-02	8,0E-03	<u>-8,0E-03</u>	2,8E-02
14	B26	<u>-9,5E-01</u>	8,4E-01	2,2E-01	<u>-3,7E-02</u>		9,6E-02	9,0E-03	7,0E-03	1,3E-02	<u>-8,0E-03</u>	1,8E-02
14	B27	<u>-9,6E-01</u>	2,8E-01	<u>-9,0E-03</u>	<u>-3,7E-02</u>		9,8E-02	<u>-5,0E-03</u>	3,6E-02	8,0E-03	<u>-2,1E-02</u>	2,1E-02
15	B28	<u>-3,6E-01</u>	1,1E+00	1,2E-01	6,0E-03		3,5E-03	<u>-1,7E-02</u>	6,3E-02	4,0E-03	1,8E-02	3,0E-03
15	B29	<u>-4,8E-01</u>	8,9E-01	2,7E-02	<u>-1,6E-02</u>		<u>-1,8E-02</u>	<u>-1,7E-02</u>	2,2E-01	3,0E-03	<u>-1,6E-02</u>	3,7E-02

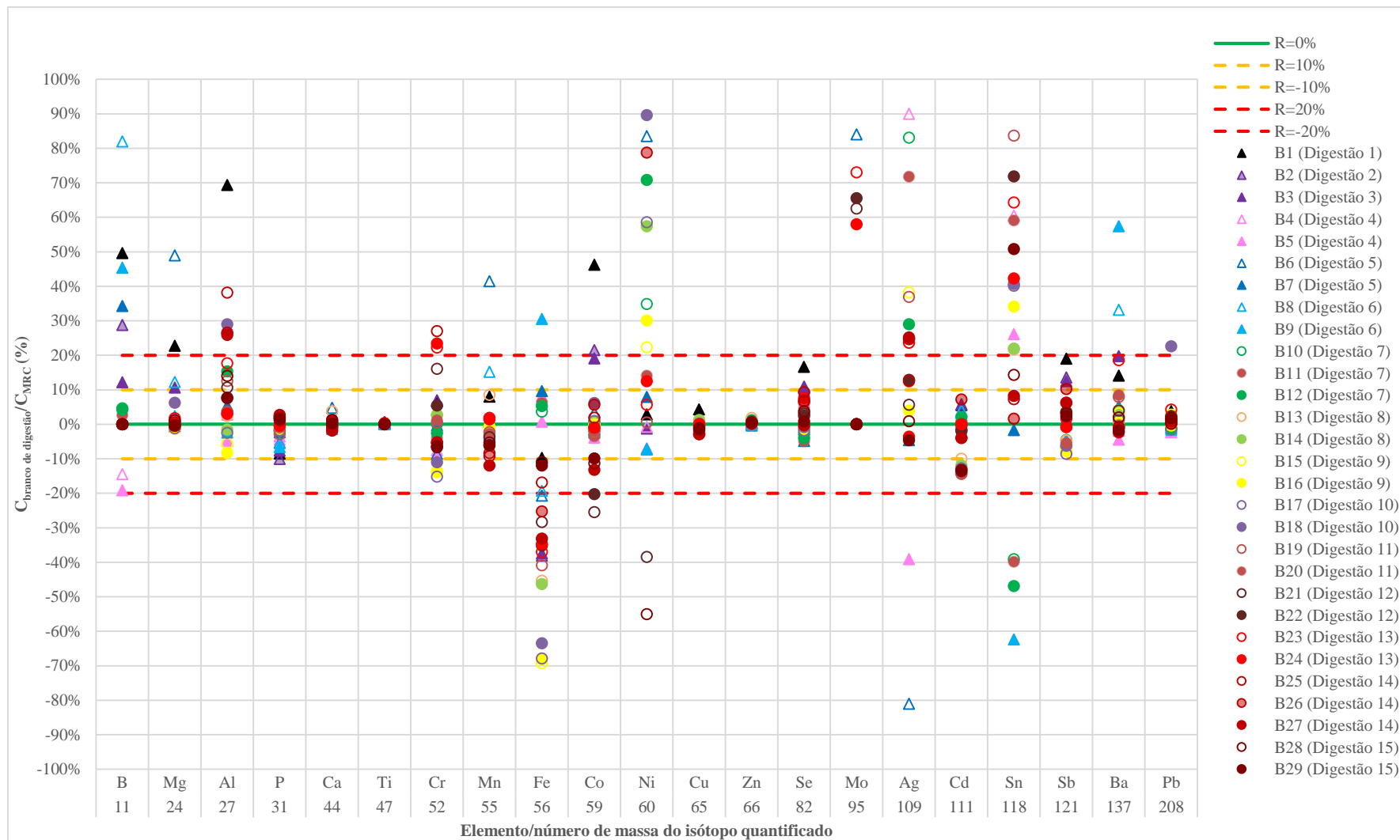


Figura 47 – Dispersão das razões entre a concentração calculada de vários elementos nos brancos de digestão e a concentração de referência do MRC ERM DB001

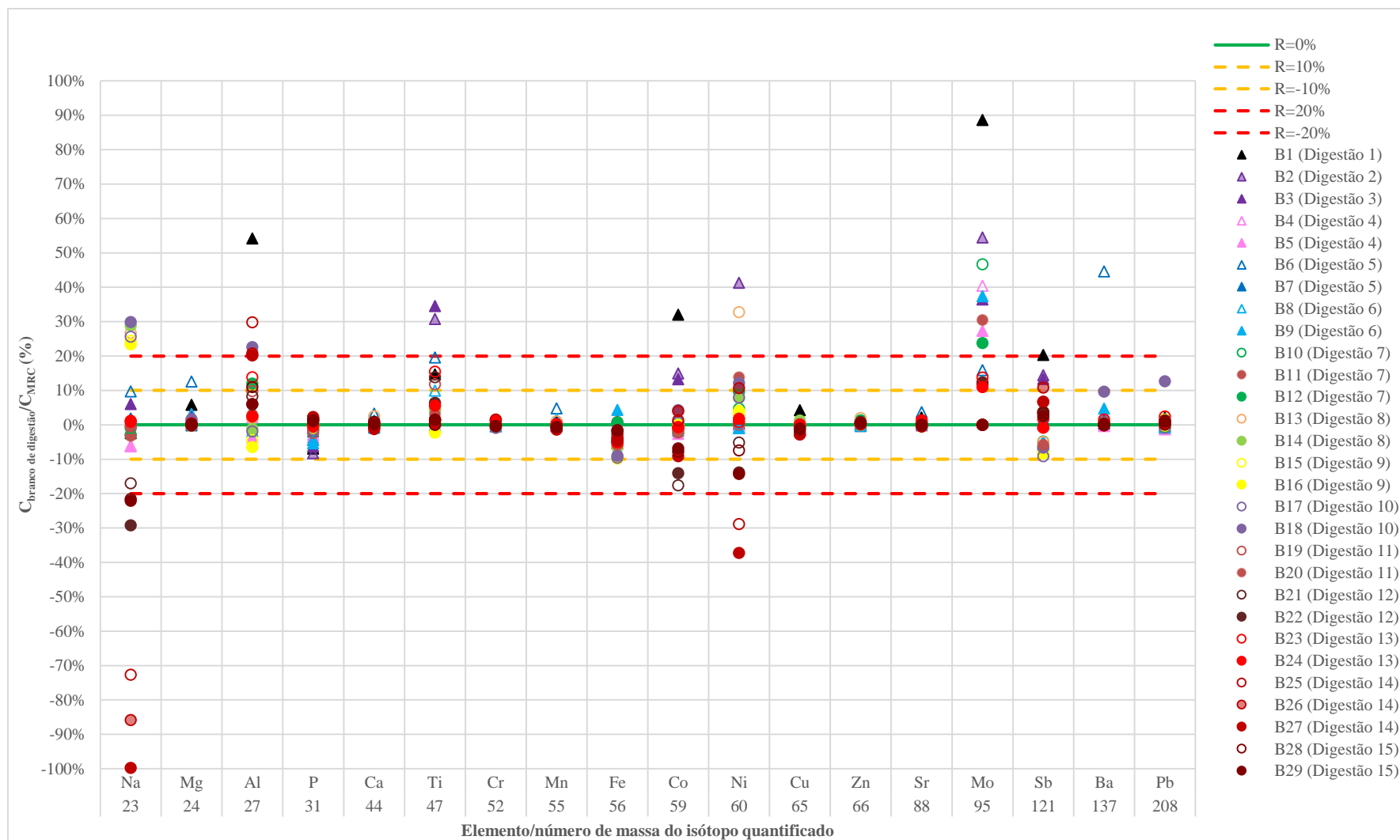


Figura 48 – Dispersão das razões entre a concentração calculada de vários elementos nos brancos de digestão e a concentração de referência MRC GBW 09101b

#### 4.1.4. Avaliação da estabilidade das soluções de cabelo digerido

As soluções de cabelo digerido foram analisadas em vários dias para avaliar a sua estabilidade ao longo do tempo. Foram escolhidos três conjuntos de soluções referentes a três digestões de MRC cabelo. A média das concentrações obtidas na primeira análise foi definida como a concentração de referência, relativamente à qual foram calculadas as recuperações obtidas nas análises subsequentes. Essas recuperações correspondem, portanto, à razão (em percentagem) entre a concentração média obtida na análise de cada conjunto de réplicas de digestão em cada um dos dias de análise e a concentração média obtida no 1º dia em que cada uma dessas soluções foi analisada. Neste contexto, e considerando apenas os resultados que cumpriam o controlo de qualidade associado a cada dia de análise, foram traçadas curvas para a variação da percentagem de recuperação, representadas na **Figura 49**, **Figura 50** e **Figura 51**. As descontinuidades nas linhas dos gráficos são explicadas pelo incumprimento dos requisitos de controlo de qualidade no dia de análise correspondente.

A análise das **Figura 49**, **Figura 50** e **Figura 51** não permite identificar qualquer tendência de acréscimo ou decréscimo contínuo da percentagem de recuperação ao longo do tempo, verificando-se que a recuperação média varia em valores próximos de 100%, aumentando e diminuindo em função do dia de análise. Essas variações dever-se-ão à própria variabilidade de cada um dos dias de análise e não à estabilidade das soluções, uma vez que não se identifica uma tendência. Verifica-se ainda que são obtidas maiores variações para o MRC ERM DB001 (**Figura 49** e **Figura 50**), comparativamente ao MRC GBW 09101b (**Figura 51**). A maior variação no caso do MRC ERM DB001 pode ser explicada pelas concentrações mais baixas que este MRC apresenta. Um dos elementos para o qual se verifica uma maior variação é o Al (**Figura 50**), que é, de acordo com a experiência da adquirida no serviço de ICP do LCA, um dos elementos para o qual a ocorrência de contaminações é mais frequente.

Uma avaliação mais rigorosa da estabilidade das soluções digeridas exigiria um maior número de dias de análise. Contudo, com base neste estudo preliminar, pode afirmar-se que a solução de cabelo digerido mantém-se estável ao longo de pelo menos três meses (período abrangido pelos resultados apresentados).

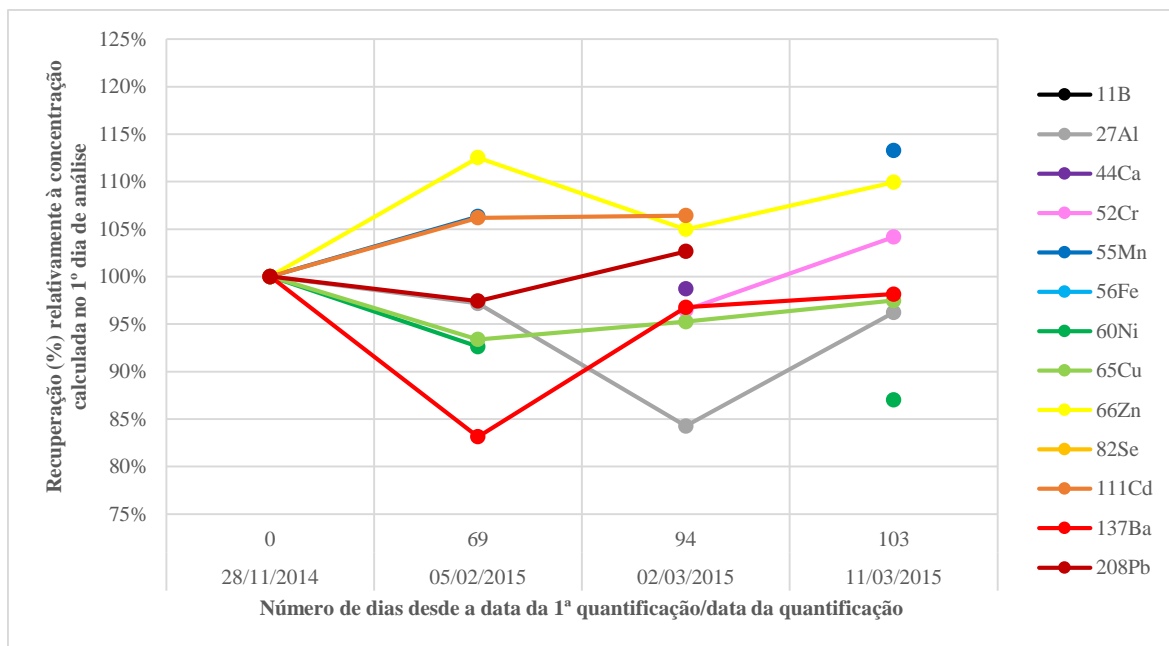


Figura 49 – Variação das concentrações médias calculadas, relativamente à concentração média obtida na 1ª quantificação por ICP-MS, para três soluções obtidas numa das digestões do MRC ERM DB001

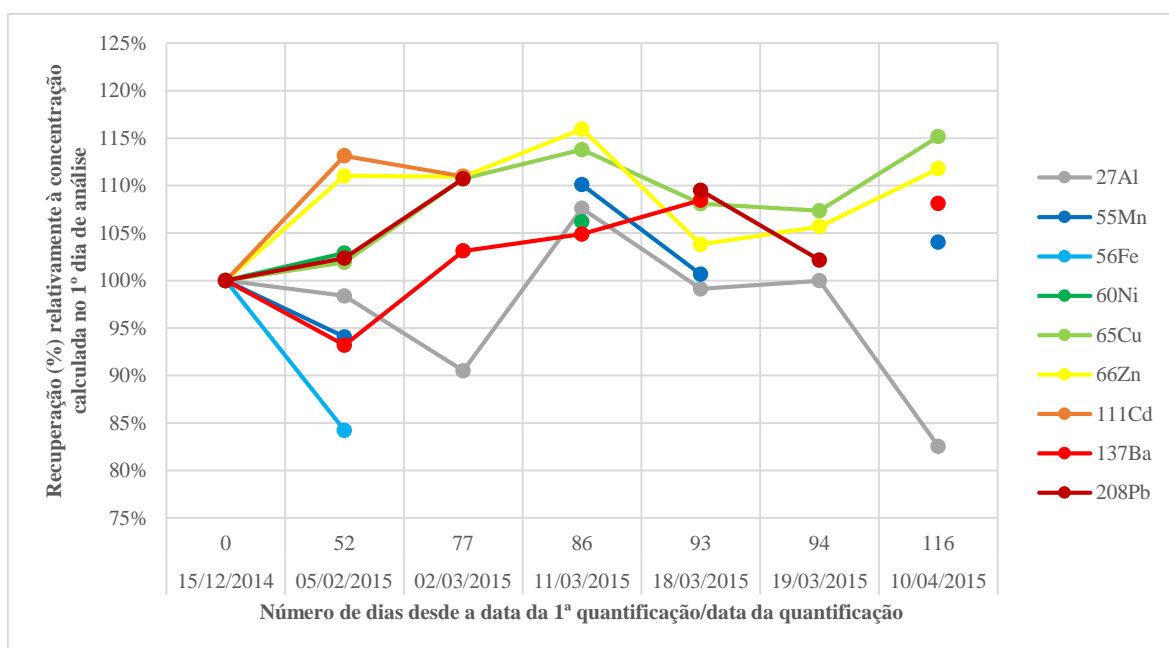


Figura 50 – Variação das concentrações médias calculadas, relativamente à concentração média obtida na 1ª quantificação por ICP-MS, para duas soluções obtidas numa das digestões do MRC ERM DB001

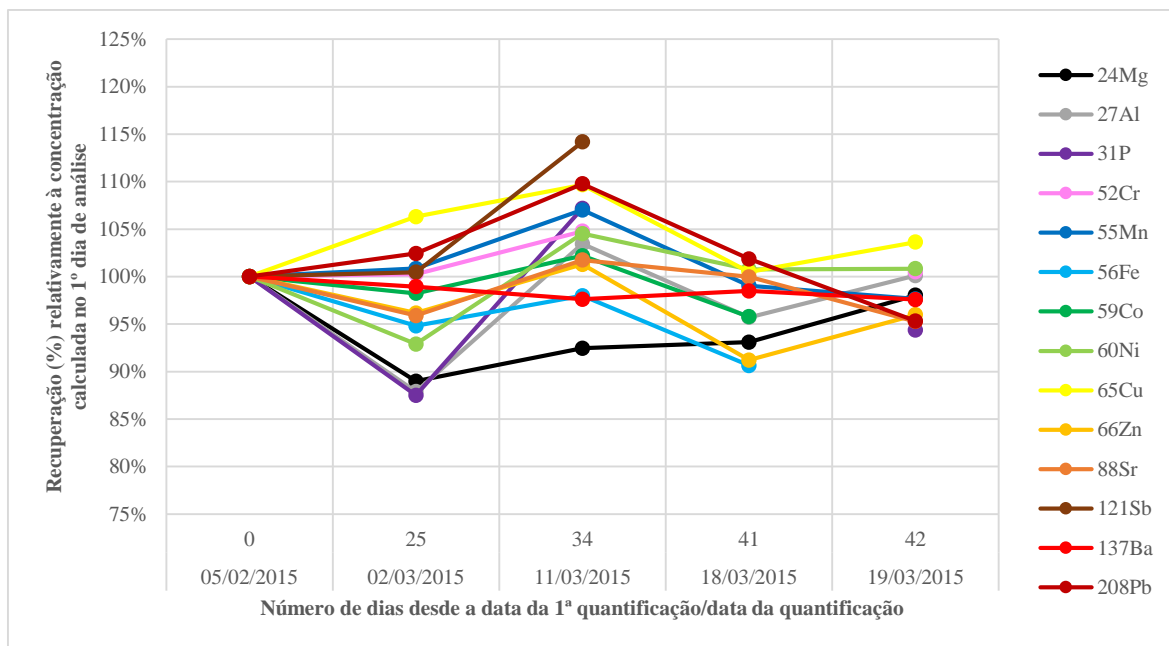


Figura 51 – Variação das concentrações médias calculadas, relativamente à concentração média obtida na 1ª quantificação por ICP-MS, para três soluções obtidas numa das digestões do MRC GBW 09101b

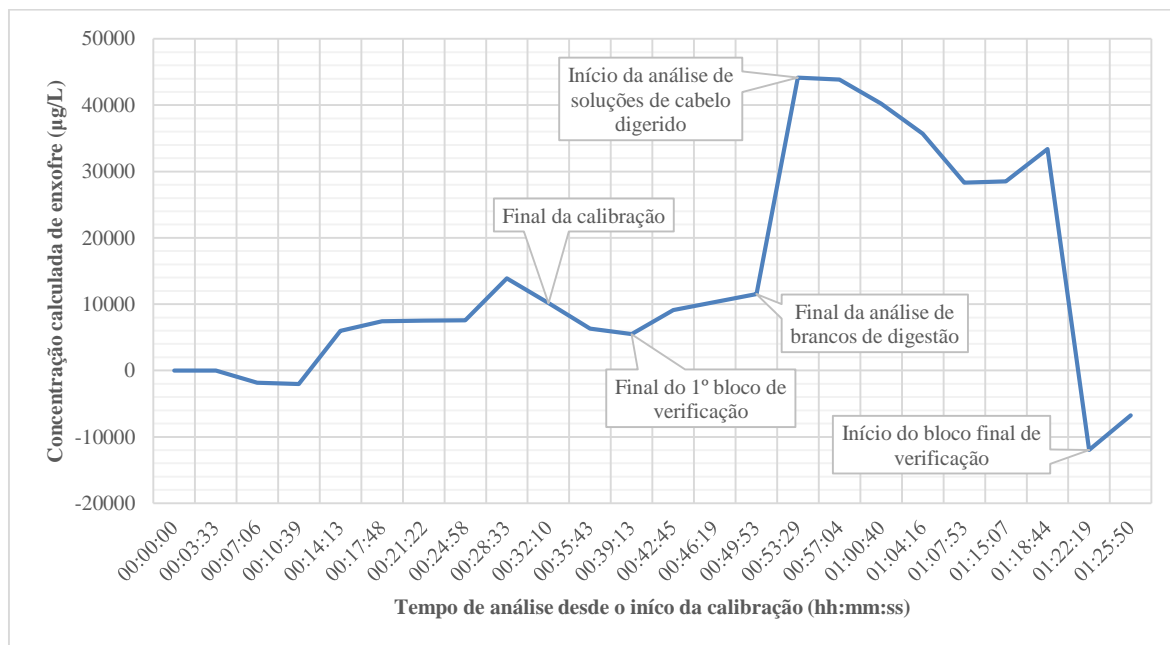
#### 4.1.1. Escolha do padrão interno para a quantificação por ICP-MS

Variações de sinal que não são representativas de variações na concentração podem ocorrer em ICP-MS devido a alterações das condições de operação do equipamento durante a análise e a efeitos de matriz. A utilização de um padrão interno permite minimizar a influência dessas variações, se estas tiverem aproximadamente o mesmo efeito na aquisição do sinal do analito e do próprio padrão interno. O padrão interno ideal é aquele para o qual se verifica uma variação da intensidade do sinal medido diretamente proporcional à variação do sinal do analito, i.e. a razão entre os sinais do analito e do padrão interno permanece constante, independentemente das variações das condições instrumentais. Neste contexto, a melhor forma de proceder à correção com o padrão interno seria usar a razão entre o sinal de dois isótopos do mesmo analito, i.e. usar como padrão interno um dos isótopos do analito quantificado (técnica de diluição isotópica). Contudo, a aplicação deste tipo de técnica possui restrições em termos de custos e aplicabilidade que limitam a sua utilidade prática (Finley-Jones *et al.* 2008). Assim, é normalmente usado um conjunto relativamente pequeno de isótopos que permita realizar uma correção adequada na quantificação de vários elementos ao longo de todo o espectro de massas. No LCA, os isótopos incluídos na solução de padrão interno são:  $^6\text{Li}$ ,  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{159}\text{Tb}$  e  $^{209}\text{Bi}$ .

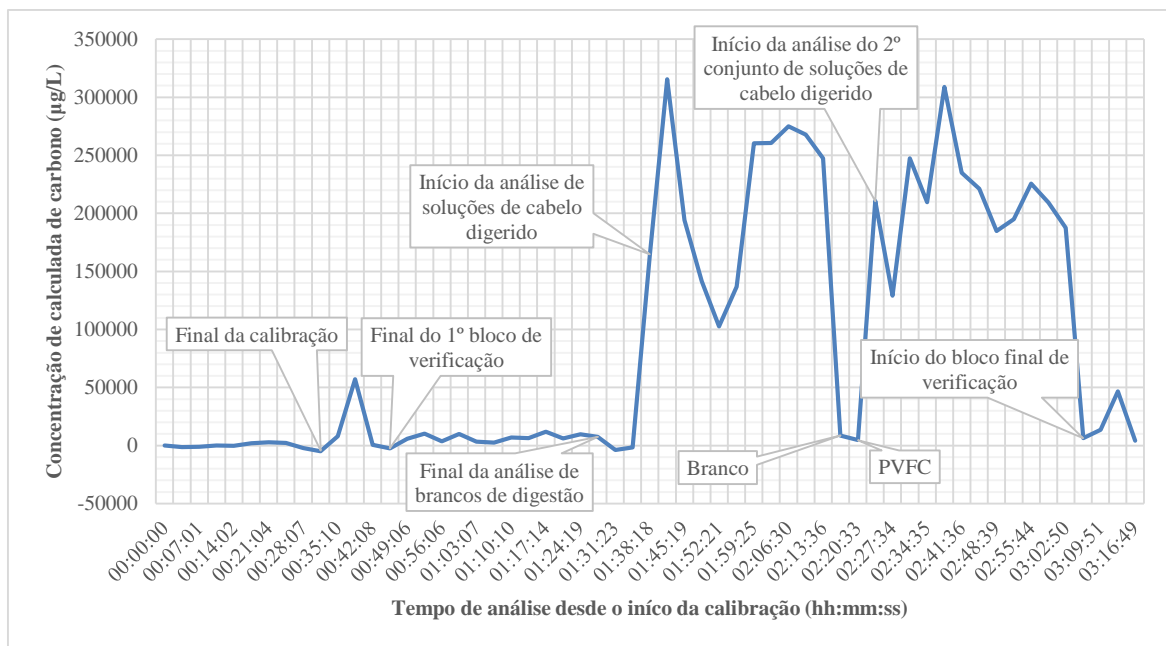
Como descrito anteriormente, a correção dos valores de sinal analítico obtidos para os vários elementos envolve o ajuste desse sinal em função da percentagem de recuperação



obtida para o padrão interno ( $R_{PI}$ ) relativamente à solução de referência (a primeira solução analisada para a construção da função de calibração). Idealmente, o valor de  $R_{PI}$  deveria manter-se próximo de 100% durante toda a análise, pois isso significaria que não ocorreram variações significativas nas condições de quantificação entre a calibração e a análise das soluções de concentração desconhecida. Existem vários motivos para a ocorrência de variações significativas nos valores de  $R_{PI}$ , entre os quais efeitos de matriz, devidos à diferença entre a matriz dos padrões de calibração e das soluções de concentração desconhecida. Esse tipo de diferenças foi avaliado neste trabalho através da quantificação de alguns dos elementos que constituem a matriz do cabelo. Dois dos elementos presentes em maior quantidade no cabelo são o carbono (C) e o enxofre (S). Na **Figura 52** e na **Figura 53** são apresentados, respetivamente, os gráficos da concentração calculada de enxofre e de carbono para as diferentes soluções analisadas por ICP-MS em dois dias.



**Figura 52** – Concentração de enxofre ( $^{33}\text{S}$ ) calculada para várias soluções analisadas por ICP-MS

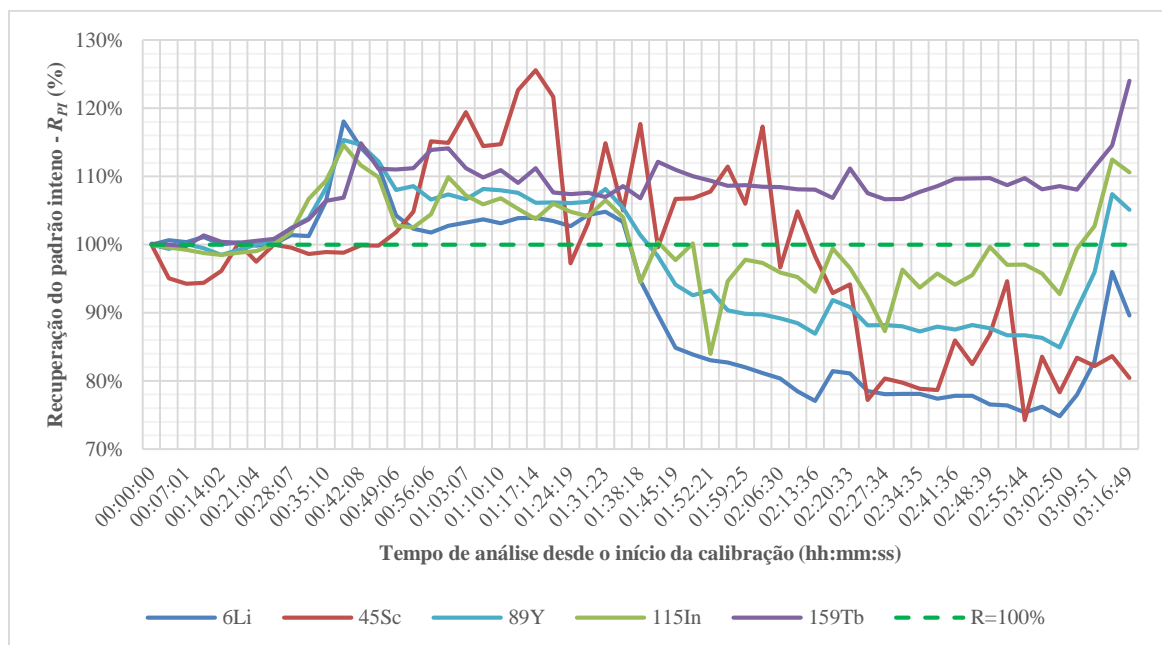


**Figura 53** – Concentração de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) calculada para várias soluções analisadas por ICP-MS

As concentrações de  $^{13}\text{C}$  e  $^{33}\text{S}$  indicadas nos gráficos da **Figura 52** e da **Figura 53** foram calculadas em modo semiquantitativo (já referido no capítulo 3). Embora esse modo de quantificação leve frequentemente à obtenção de erros de justeza significativos, esse fator não é importante neste caso, pois a principal finalidade desses gráficos é comparar a concentração dos elementos referidos nas soluções de cabelo digeridas e nos padrões de calibração. Contudo, constata-se que foram obtidas concentrações de  $^{33}\text{S}$  próximas de 50000  $\mu\text{g/L}$  na análise das soluções de cabelo digerido, o que, tendo em conta a diluição realizada, corresponde a uma concentração de 50  $\text{mg/g}$  e, portanto, a uma concentração mássica de 5%. Esse valor está de acordo com a concentração conhecida de enxofre no cabelo. Assim, pode-se concluir que, após a digestão, a maioria do enxofre contido no cabelo permanece em solução, o que pode ser explicado pela oxidação desse elemento a sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ).

A **Figura 52** e a **Figura 53** permitem concluir que concentração de S e C é superior nas soluções de cabelo digerido comparativamente aos padrões de calibração, o que é explicado pelo facto dos padrões de calibração terem sido preparados em matriz ácida aquosa, tendo, portanto, uma menor carga orgânica que as soluções de cabelo digerido. Em alguns dos dias de análise por ICP-MS, foi identificada uma variação significativa da percentagem de recuperação do padrão interno (“*drift*”) aquando do início da análise de soluções de cabelo digerido, o que indica um efeito de matriz considerável, que se deverá à diferença na carga orgânica das matrizes dos padrões de calibração e das soluções de cabelo digerido. Na **Figura 54** é apresentado a recuperação obtida para os vários isótopos que

podem ser usados como padrão interno, ao longo de uma análise por ICP-MS. A curva correspondente ao  $^{209}\text{Bi}$  não é apresentada porque se verificou uma grande variação na recuperação obtida para esse isótopo, o que está de acordo com a experiência na operação do equipamento de ICP-MS do LCA e invalida o uso deste elemento como padrão interno.



**Figura 54** – Variação da percentagem de recuperação do padrão interno ( $R_{PI}$ ) ao longo de uma análise por ICP-MS para os vários isótopos usados como padrão interno

A análise do gráfico da **Figura 54** permite constatar que na primeira metade da análise, em que apenas foram aspiradas soluções aquosas (padrões de calibração e brancos de digestão), as recuperações de padrão interno ( $R_{PI}$ ) para os vários isótopos indicados seguem aproximadamente a mesma tendência. A partir da análise de soluções de cabelo digerido, cujo início corresponde ao tempo de análise 01:38:18 no gráfico da **Figura 54**, ocorre um decréscimo notório dos valores de  $R_{PI}$  de  $^6\text{Li}$ ,  $^{89}\text{Y}$  e  $^{115}\text{In}$ . Para além disso, passam a existir diferenças claras nos valores de  $R_{PI}$  dos vários isótopos considerados. Portanto, a escolha do isótopo usado como padrão interno influencia significativamente os resultados obtidos na quantificação dos vários analitos no cabelo.

Alguns laboratórios que usam a técnica de ICP-MS optam por usar um único isótopo como padrão interno em toda a gama de massas abrangida pelos isótopos quantificados (Finley-Jones *et al.* 2008). Um dos isótopos usados frequentemente para esse propósito é o  $^{115}\text{In}$ , pois este possui uma massa intermédia, não está sujeito normalmente a interferências significativas e é pouco abundante na Natureza. Estas características são vantajosas, tendo em conta que a massa do padrão interno deverá estar próxima da do analito, sendo que neste

aspecto o  $^{115}\text{In}$  constitui uma solução de compromisso (Finley-Jones *et al.* 2008). Para além disso, o padrão interno deverá estar sujeito ao mínimo possível de interferências e não deverá estar presente numa concentração significativa nas soluções analisadas, o que são também condições cumpridas pelo  $^{115}\text{In}$ . Algumas publicações demonstram que o uso de  $^{115}\text{In}$  como padrão interno proporciona uma correção adequada para uma grande variedade de elementos (Vandecasteele *et al.* 1988, Wang *et al.* 1991), o que está de acordo com a experiência do LCA relativa à utilização da técnica de ICP-MS. Porém, no contexto deste trabalho, identificou-se que, embora em alguns dias de análises por ICP-MS a aplicação do  $^{115}\text{In}$  permitisse efetivamente a obtenção de resultados com uma exatidão satisfatória, noutros dias a substituição desse padrão interno por outros isótopos/elementos permitia a obtenção de melhores resultados na quantificação de alguns elementos. Essa observação é justificada pelas diferenças nos valores de  $R_{PI}$  obtidos para os isótopos que podem ser usados como padrão interno. Constatou-se que essas diferenças acentuavam-se após o início da análise de soluções de cabelo digerido, como demonstrado pelo gráfico da **Figura 54**.

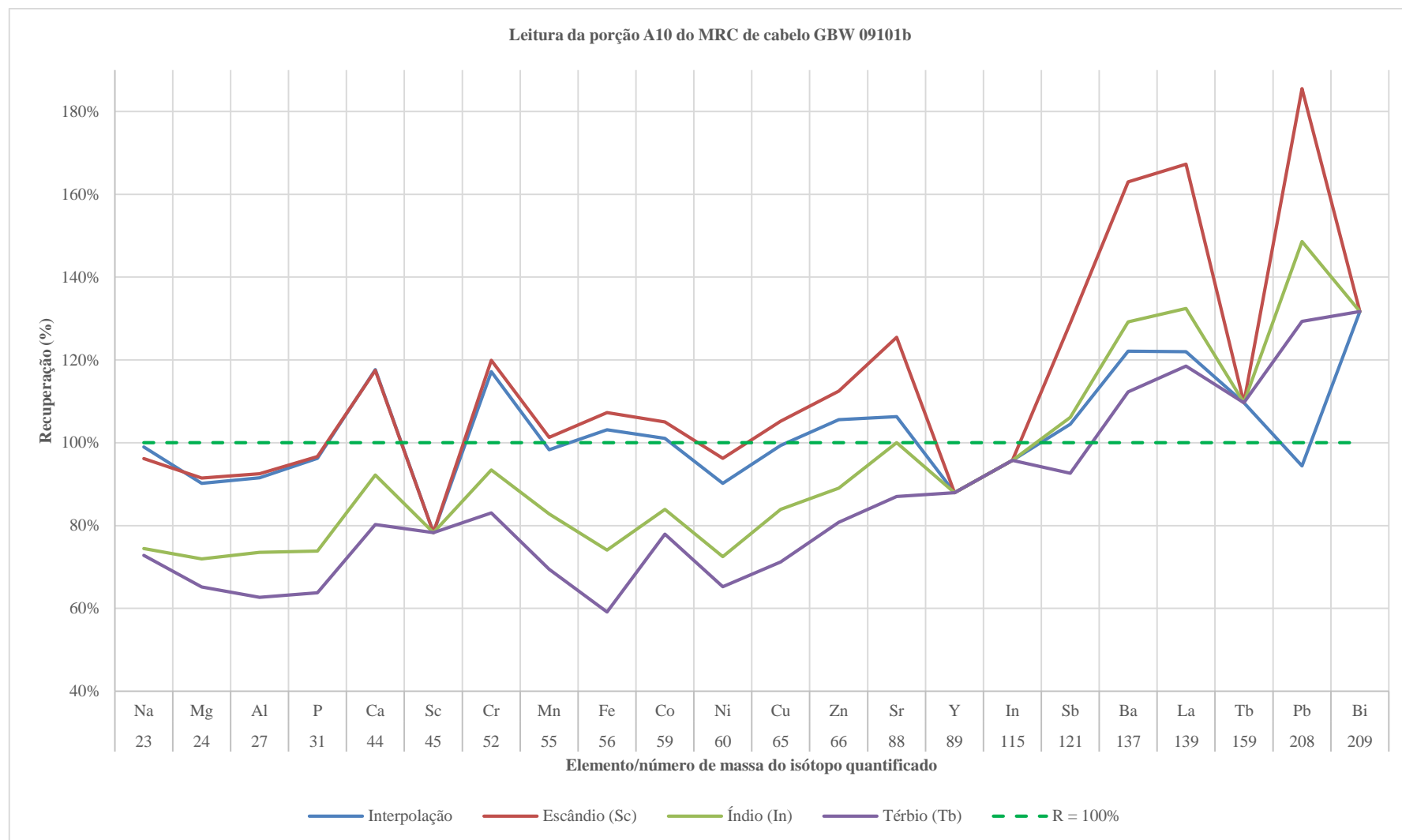
Após a análise dos resultados obtidos nos dias de quantificação por ICP-MS para os quais se verificou a obtenção de diferenças significativas nas percentagens de recuperação obtidas para o padrão interno, definiu-se que a correção com o padrão interno seria realizada de acordo com o indicado na **Tabela 22**.

**Tabela 22** – Gammas de massas abrangidas por cada um dos isótopos usados como padrão interno na análise por ICP-MS de soluções de cabelo digerido

Padrões internos	Gammas de massas abrangidas por cada padrão interno
$^{45}\text{Sc}$	7 (Li) a 83 (Kr)
$^{115}\text{In}$	85 (Rb) a 121 (Sb)
$^{159}\text{Tb}$	125 (Te) a 238 (U)

Como se verifica na **Tabela 22**, os isótopos  $^6\text{Li}$ ,  $^{89}\text{Y}$  e  $^{209}\text{Bi}$  não foram incluídos no grupo de padrões internos usados na correção dos sinais dos elementos quantificados. No caso do  $^{209}\text{Bi}$ , essa exclusão é justificada pela instabilidade da percentagem de recuperação obtida para esse isótopo durante a quantificação. Para os elementos com número de massa próxima do  $^6\text{Li}$ , verificou-se que o  $^{45}\text{Sc}$  proporcionava uma correção mais eficiente (maior exatidão). Para os elementos com número de massa próxima do  $^{89}\text{Y}$ , verificou-se que o  $^{45}\text{Sc}$  e o  $^{115}\text{In}$  resultavam em correções mais eficientes.

A influência da escolha do padrão interno na quantificação dos vários elementos é demonstrada na **Figura 55** referente à análise de uma das porções digerida do MRC GBW 09101b considerando diferentes modos de correção com padrão interno.



**Figura 55 – Variação da percentagem recuperação para vários isótopos distribuídos ao longo do espectro de massa, considerando diferentes modos de correção com padrão interno, na leitura do MRC de cabelo GBW 09101b num dos dias de análise por ICP-MS**

#### 4.1.2. Avaliação da interferência do enxofre na quantificação por ICP-MS

Uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído foi preparada e analisada por ICP-MS, para avaliar a concentração obtida para os isótopos mais suscetíveis a interferências isobáricas devidas à presença de enxofre no plasma. Na **Tabela 23**, são apresentados os isótopos/analitos considerados e indicadas as respectivas interferências isobáricas devidas à presença de enxofre e as concentrações obtidas para cada um desses isótopos na análise da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído.

**Tabela 23** – Interferências isobáricas formadas pela presença de enxofre no plasma (May *et al.* 1998)

Isótopo (analito)	Interferências isobáricas com enxofre	Concentração obtida para o analito na análise de uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4$ por ICP-MS
$^{47}\text{Ti}$	$^{32}\text{S}^{14}\text{N}^+\text{H}^+$ , $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$ , $^{33}\text{S}^{14}\text{N}^+$	<0,17 $\mu\text{g/L}$ (LD)
$^{52}\text{Cr}$	$^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$ , $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$	<0,07 $\mu\text{g/L}$ (LD)
$^{55}\text{Mn}$	$^{23}\text{Na}^{32}\text{S}$	<0,03 $\mu\text{g/L}$ (LD)
$^{65}\text{Cu}$	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$ , $^{32}\text{S}^{33}\text{S}^+$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$ , $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$	<0,66 $\mu\text{g/L}$ (LD)
$^{66}\text{Zn}$	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$ , $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$ , $^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$ , $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$ , $^{32}\text{S}^{34}\text{S}^+$ , $^{33}\text{S}_2^+$	<3,33 $\mu\text{g/L}$ (LD)
$^{82}\text{Se}$	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$	<13,53 $\mu\text{g/L}$

De notar que a concentração prevista de enxofre nas soluções de cabelo digerido é de  $\approx 50 \text{ mg/L}$ , como referido anteriormente. Assim, a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído foi preparada de forma a que a concentração de enxofre fosse próxima desse valor. Tendo em conta as concentrações indicadas na **Tabela 23**, pode-se verificar que as concentrações obtidas para os vários isótopos considerados, à exceção do  $^{82}\text{Se}$ , são inferiores ao LD. No caso do  $^{82}\text{Se}$ , como é obtido um valor de concentração muito superior ao dos restantes isótopos, alguns dos quais, comparativamente ao  $^{82}\text{Se}$ , estão sujeitos a um maior número de interferências com envolvendo espécies de enxofre, essa elevada concentração poderá ser justificada por contaminação da solução e não pelo efeito da interferência isobárica indicada.

#### 4.1.3. Escolha dos elementos e respectivas gamas de trabalho para a validação

Tendo em conta os resultados obtidos no estudo do desenvolvimento do sistema analítico de quantificação de diversos analitos por ICP-MS, avaliado através de um conjunto de ensaios efetuados ao MRC de cabelo, os elementos selecionados para a validação subsequente desse sistema analítico foram Cu, Zn e Pb. A escolha destes elementos baseou-se no facto de serem, de entre os elementos com concentrações certificadas em ambos os MRC de cabelo, aqueles para os quais o sistema analítico desenvolvido apresenta bons resultados em termos de exatidão.

Com base nos valores de referência para a concentração de Cu, Pb e Zn no cabelo (**Tabela 40**, **Tabela 41** e **Tabela 44** – Anexos), e tendo em conta os intervalos de concentração para os quais se verificou uma exatidão adequada na quantificação dos padrões de calibração, de acordo com os requisitos de controlo de qualidade estipulados, foram definidas as gamas de trabalho indicadas na **Tabela 24**, para a validação do sistema analítico na quantificação desses elementos.

**Tabela 24** – Gamas de trabalho definidas para os elementos considerados na validação do sistema analítico

Elemento/isótopos	Gama de trabalho (µg/L)	
	Mínimo (LQ)	Máximo
<sup>65</sup> Cu	2	100
<sup>66</sup> Zn	10	1000
<sup>206</sup> Pb + <sup>207</sup> Pb + <sup>208</sup> Pb	1	100

## 4.2. Validação do sistema analítico

Na sequência dos ensaios preliminares realizados no contexto do estudo e desenvolvimento do sistema analítico, procedeu-se à validação do sistema analítico, de acordo com os procedimentos indicados anteriormente. Nesta secção, são apresentados e discutidos, de forma detalhada, os resultados obtidos para o Pb na avaliação das várias características de desempenho do sistema analítico consideradas. Os resultados referentes à validação do sistema analítico na quantificação de Cu e Zn em cabelo são apresentados na secção de Anexos. A discussão dos resultados obtidos para esses elementos durante o processo de validação são apresentados na secção 4.2.3.

### 4.2.1. Verificação da exatidão na etapa de quantificação

Tendo em conta que o sistema analítico avaliado neste trabalho corresponde a uma análise quantitativa, a sua validação está dependente das conclusões decorrentes da análise dos resultados numéricos obtidos. Assim, é essencial que a quantificação se realize nas devidas condições, assegurando que o equipamento opera corretamente e gera resultados que são representativos das características das amostras analisadas.

Com os resultados obtidos na análise das soluções de controlo podem ser construídas cartas de controlo que permitem avaliar a exatidão global da quantificação e se os critérios definidos para o controlo de qualidade são adequados. As cartas de controlo apresentadas referem-se aos resultados obtidos para as soluções PVFC RELACRE junho 2012, RELACRE julho 2014, PVFC(CT1), PVFC(CT2) e PVLQ e são apresentadas na **Figura 56** à **Figura 59**. Os pontos a vermelho e/ou assinalados com um rótulo correspondem a resultados rejeitados.

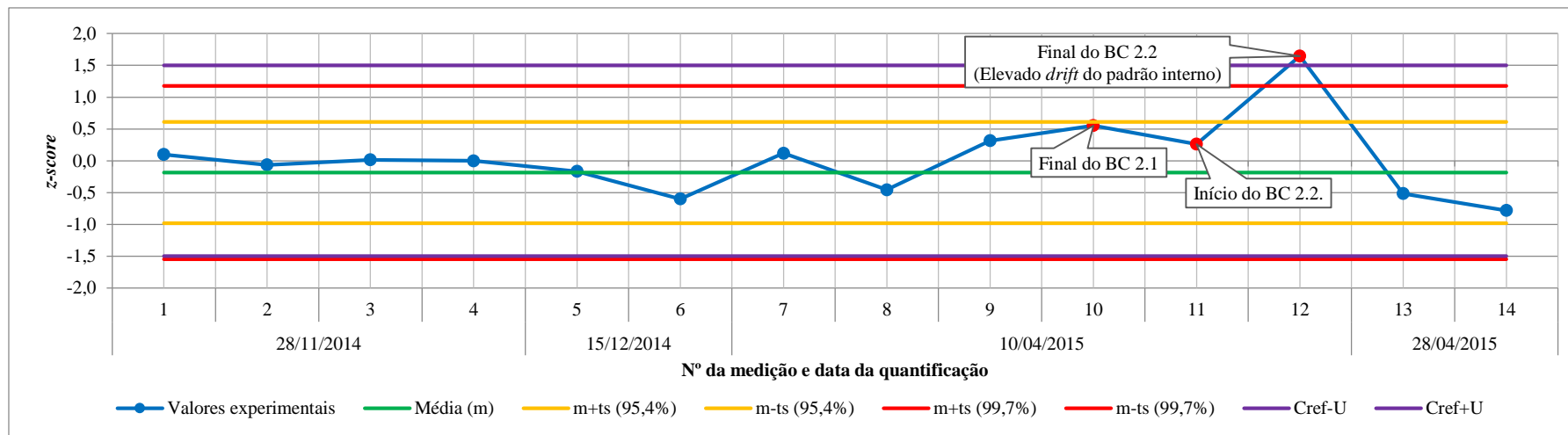


Figura 56 – Carta de controle para o *z-score* na análise de Pb por ICP-MS do PVFC RELACRE junho 2012 (Cref≈18±3 µg/L)

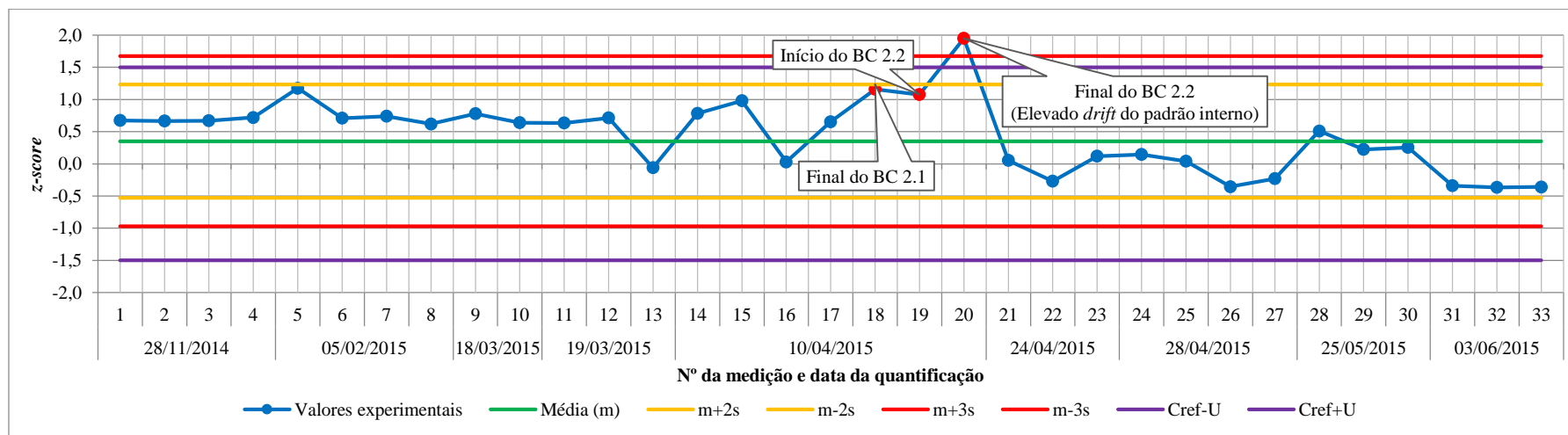


Figura 57 – Carta de controle para o *z-score* na análise de Pb por ICP-MS do PVFC RELACRE julho 2014 (Cref≈19±3 µg/L)



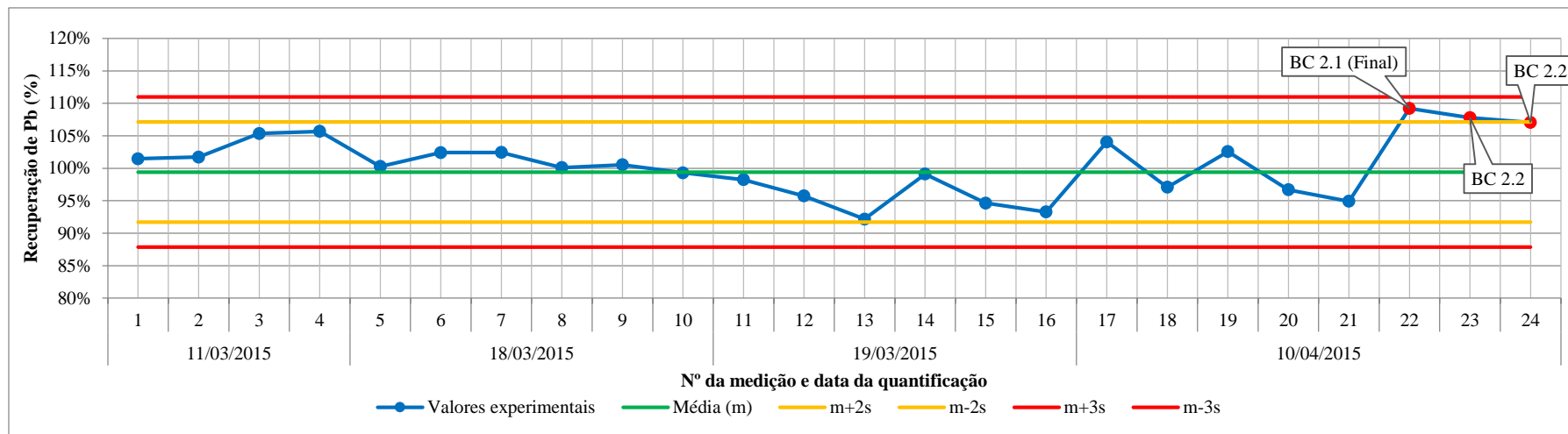


Figura 58 – Carta de controle para a recuperação de Pb na análise por ICP-MS do PVFC(CT1) (Cref≈50 µg/L)

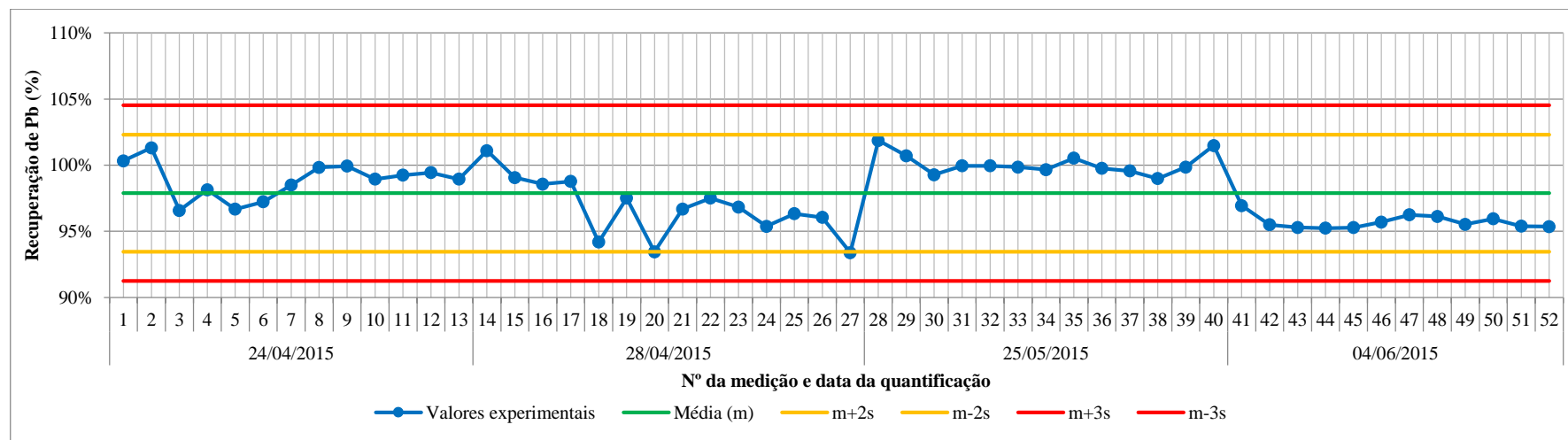


Figura 59 – Carta de controle para a recuperação de Pb na análise por ICP-MS do PVFC(CT2) (Cref≈10 µg/L)

As cartas de controlo apresentadas permitem concluir que os resultados obtidos tendem a aproximar-se do valor médio teórico e expectável de concentração para as várias soluções de controlo, pois são obtidos valores de recuperação próximos de 100% e *z-scores* próximos de zero, o que é indicativo de uma exatidão satisfatória.

Na **Figura 58**, verifica-se que o valor médio obtido para o *z-score* na análise do PVFC RELACRE julho 2014 (*z-score*≈0,5) é o que mais se afasta do valor ideal de *z-score*. Esse valor de *z-score* corresponde à obtenção de uma concentração média de 20 µg/L. Considerando que a concentração de referência de Pb nessa solução é 19 µg/L, pode-se inferir que a diferença obtida entre a concentração média e o valor de referência não é significativa, uma vez que a incerteza expandida relativa associada à concentração de referência é 15,8% (**Tabela 43**). O valor médio obtido para o *z-score* (≈0,5) também é consistente com o valor obtido pelo LCA na participação no EAA da RELACRE (*z-score* = 0,6).

Considerando o primeiro valor das cartas de controlo representadas, verifica-se que para a solução RELACRE julho 2014 é obtido um *z-score* médio de ≈0,5, mas para o PVFC RELACRE junho 2012, obtém-se um *z-score* médio de ≈0. O desvio obtido nos resultados da solução RELACRE julho 2014 dever-se-á às características da solução e não a um erro sistemático ou a um problema na quantificação, pois em vários dias verificou-se a obtenção de um aparente erro sistemático positivo apenas na análise da solução RELACRE julho 2014, sendo que para as restantes soluções de controlo esse erro não se verificou.

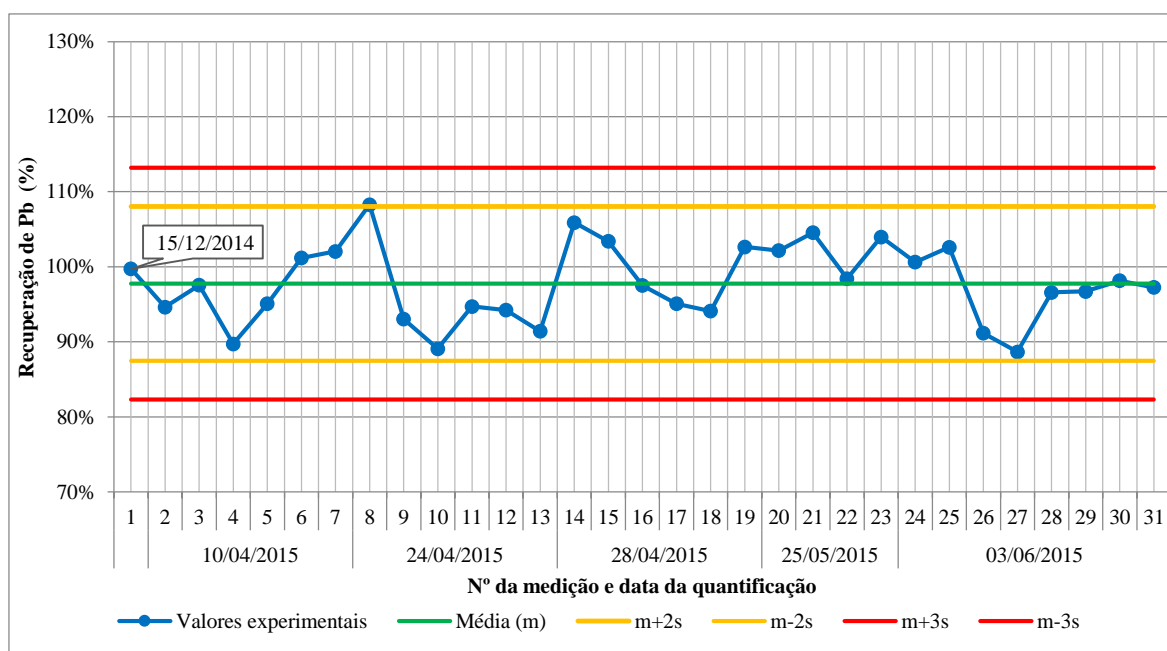
Uma outra conclusão que pode ser retirada da análise das cartas de controlo das soluções dos EAA da RELACRE (**Figura 56 e Figura 57**) é que o critério de *z-score* recomendado pela RELACRE para definir um erro de justeza aceitável ( $-3 \leq z\text{-score} \leq 3$ ) não é adequado à realidade do LCA. Observa-se que todos os valores obtidos para o *z-score* estão contidos no intervalo entre -3 e 3, incluindo valores que ultrapassam claramente os limites definidos na carta de controlo. Para ambos os PVFC, a amplitude entre os limites de ação das cartas de controlo expressa em *z-score* (linhas a vermelho), é de 3 ( $\pm 1,5$ ). Este é um valor bastante inferior à amplitude de 6 ( $\pm 3$ ) considerada pela RELACRE para definir resultados aceitáveis na análise destas soluções. O intervalo de valores de *z-score* definidos pelos limites de ação nas cartas de controlo apresentadas corresponde a um intervalo de recuperação com uma amplitude de aproximadamente 32% ( $\pm 16\%$ ) para ambos os PVFC (RELACRE junho 2012 e RELACRE julho 2014). Na **Tabela 43**, verifica-se que as

incertezas expandidas relativas para os PVFC RELACRE junho 2012 e RELACRE julho 2014 são, respectivamente, 16,7% e 15,8%. Portanto, os intervalos definidos pelos limites de ação das cartas de controlo obtidas para os respectivos PVFC correspondem aproximadamente à incerteza expandida associada ao valor de referência. Essa relação é mais evidente na carta de controlo referente ao PVFC RELACRE junho 2012, em que as linhas a roxo (incerteza expandida) estão quase sobrepostas com as linhas a vermelho (limites de ação). Assim, conclui-se que a incerteza é neste caso, um melhor requisito para avaliar a validade dos resultados, comparativamente ao *z-score*.

#### 4.2.2. Avaliação das características de desempenho do sistema analítico

- **Seletividade**
  - **Testes de recuperação**

Na **Figura 60** é apresentada a carta de controlo referente à percentagem de recuperação de Pb na análise de soluções reforçadas.



**Figura 60** – Carta de controlo para as recuperações obtidas na análise de Pb por ICP-MS em soluções de cabelo digerido reforçadas com esse elemento

Como requisito inicial de validação, definiu-se como aceitáveis recuperações de Pb contidas no intervalo  $100 \pm 20\%$ . Contudo, considerando os resultados do histórico de testes de recuperação representado na **Figura 60**, definiu-se um novo critério de aceitação para o valor dos ensaios de recuperação para a análise de Pb em cabelos por ICP-MS, que corresponde ao intervalo de recuperações de  $100 \pm 12\%$ . Este critério foi adotado porque o intervalo possui uma amplitude próxima da definida pelas linhas de aviso da carta de

controle e abrange os resultados obtidos em todos os testes de recuperação. É importante destacar que a definição deste requisito baseia-se num histórico reduzido de testes de recuperação e deverá ser revisto à medida que seja acumulado um maior histórico de resultados.

Como foi obtida uma recuperação média próxima de 100%, uma distribuição aleatória dos resultados em torno do valor médio e o requisito de validação definido é cumprido (todos os valores de recuperação estão contidos no intervalo  $100 \pm 12\%$ ), pode-se concluir que, relativamente à seletividade, o sistema analítico avaliado tem um desempenho satisfatório para a quantificação de Pb em cabelo por ICP-MS.

#### ○ Interferências isobáricas

O Pb possui a particularidade da abundância relativa dos seus isótopos poder variar significativamente tanto no tempo como no espaço (PerkinElmer 2011). Por esse motivo, a quantificação desse elemento por ICP-MS foi realizada considerando os três isótopos para os quais as abundâncias relativas podem variar significativamente:  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  e  $^{208}\text{Pb}$ . A quantificação é realizada através da aplicação de uma equação matemática para corrigir o sinal obtido para o isótopo  $^{208}\text{Pb}$ , que corresponde à soma dos sinais obtidos na quantificação de  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  e  $^{208}\text{Pb}$ . Na **Tabela 25**, são apresentadas as interferências isobáricas associadas à quantificação desses três isótopos por ICP-MS. As interferências apresentadas têm como referência um artigo de revisão onde são compiladas as interferências poliatômicas comuns em ICP-MS (May *et al.* 1998), a norma ISO referente à aplicação da técnica de ICP-MS na análise de águas (ISO 17294-1:2004) e a base de dados do *software* do equipamento.

**Tabela 25 – Interferências isobáricas comuns na quantificação de chumbo por ICP-MS (May *et al.* 1998, ISO 2004)**

Isótopo de chumbo	Abundância relativa (%)	Interferências isobáricas
$^{206}\text{Pb}$	24,1	$^{190}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$
$^{207}\text{Pb}$	22,1	$^{191}\text{Ir}^{16}\text{O}^+$
$^{208}\text{Pb}$	52,4	$^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$

As interferências isobáricas indicadas na **Tabela 25** envolvem a formação de óxidos de irídio (Ir) e platina (Pt). Consultando o relatório técnico da IUPAC que compila as massas nominais e as razões isotópicas dos vários elementos químicos (Berglund *et al.* 2011), verifica-se que o  $^{191}\text{Ir}$  é o isótopo de irídio menos abundante, com uma abundância relativa de 37,3%. Também os isótopos de platina indicados na **Tabela 25** têm baixas abundâncias relativas, de 0,1% e 7,8% para  $^{190}\text{Pt}$  e  $^{192}\text{Pt}$ , respetivamente. A análise da **Tabela 40** e da **Tabela 41** (Anexos) permite verificar que as concentrações comuns de Pt no cabelo são

muito reduzidas e significativamente inferiores às de Pb. Não foram encontrados valores de referência para a concentração de Ir no cabelo, pressupondo-se que esse elemento estará presente em quantidades vestigiais. Tendo ainda em conta o facto do equipamento de ICP-MS usado no LCA ajustar as suas condições de operação de forma a minimizar a formação de óxidos, pode-se concluir que não existem interferências isobáricas significativas na quantificação de Pb em cabelo por ICP-MS.

- **Quantificação**

- **Gama de trabalho**

A gama de trabalho de concentrações considerada na avaliação do desempenho do equipamento de ICP-MS na quantificação de Pb foi o intervalo entre 1 a 100 µg/L, o que corresponde a aproximadamente a 1 a 100 µg/g de Pb na amostra sólida de cabelo. O limite superior da gama de trabalho foi estabelecido considerando o máximo dos valores de referência para o Pb indicados na **Tabela 40** e **Tabela 41** (Anexos): 95 µg/g. Assim, a validação foi realizada numa gama de concentrações ampla, o que permite abranger uma maior diversidade de amostras.

- **Parâmetros de calibração**

Na **Tabela 26** são compilados os parâmetros das várias funções de calibração válidas obtidas no contexto deste trabalho. Todas as funções de calibração indicadas foram obtidas com pelo menos 5 padrões. Verificou-se o cumprimento do requisito estabelecido para o coeficiente de correlação de Pearson ( $r > 0,999$ ), destacado nessa tabela com o sombreado verde.

Tabela 26 – Parâmetros das funções de calibração válidas obtidas na análise de Pb por ICP-MS

Dia de análise	Bloco de calibração	Parâmetros das funções de calibração			
		$m_w$ (cps·L/μg)	$b_w$ (cps)	$b_w$ (μg/L)	$r$
28/11/2014	1	14838	937	6,3E-02	0,999909
15/12/2014	1	11352	1391	1,2E-01	0,999997
05/02/2015	1.1	8152	1344	1,6E-01	0,999993
	1.2	9184	1299	1,4E-01	0,999999
20/02/2015	1	9229	1625	1,8E-01	0,999930
02/03/2015	1	11750	629	5,4E-02	0,999948
18/03/2015	1.1	11733	412	3,5E-02	0,999971
	1.2	11887	234	2,0E-02	0,999983
19/03/2015	1.1	10918	435	4,0E-02	0,999980
	1.2	12158	1141	9,4E-02	0,999962
10/04/2015	1.1	8268	272	3,3E-02	0,999995
	2.1	6356	473	7,4E-02	0,999973
24/04/2015	1	5115	107	2,1E-02	0,999682
28/04/2015	1	12459	214	1,7E-02	0,999934
25/05/2015	1	23015	651	2,8E-02	0,999982
03/06/2015	1	22756	1159	5,1E-02	0,999988
Mínimo		5115	107	1,7E-02	0,999682
Máximo		23015	1625	1,8E-01	0,999999
(Média)		12060	803	7,3E-02	0,999949
Desvio-padrão (s)		5047	495	5,4E-02	0,000098

A variação dos parâmetros de calibração ao longo do tempo pode ser avaliada recorrendo à representação em cartas de controlo, como é recomendado no Guia 3 da RELACRE (RELACRE 1996). Contudo, esse tipo de controlo não é realizado no LCA porque, tendo em conta a experiência na operação do equipamento, verifica-se que os parâmetros da função de calibração variam consideravelmente em curtos espaços de tempo (diariamente). De notar ainda que a análise dos valores de declive e ordenada na origem não é relevante, desde que a respetiva função de calibração cumpra os restantes requisitos definidos para o controlo de qualidade.

#### ○ Ajuste da função linear de calibração

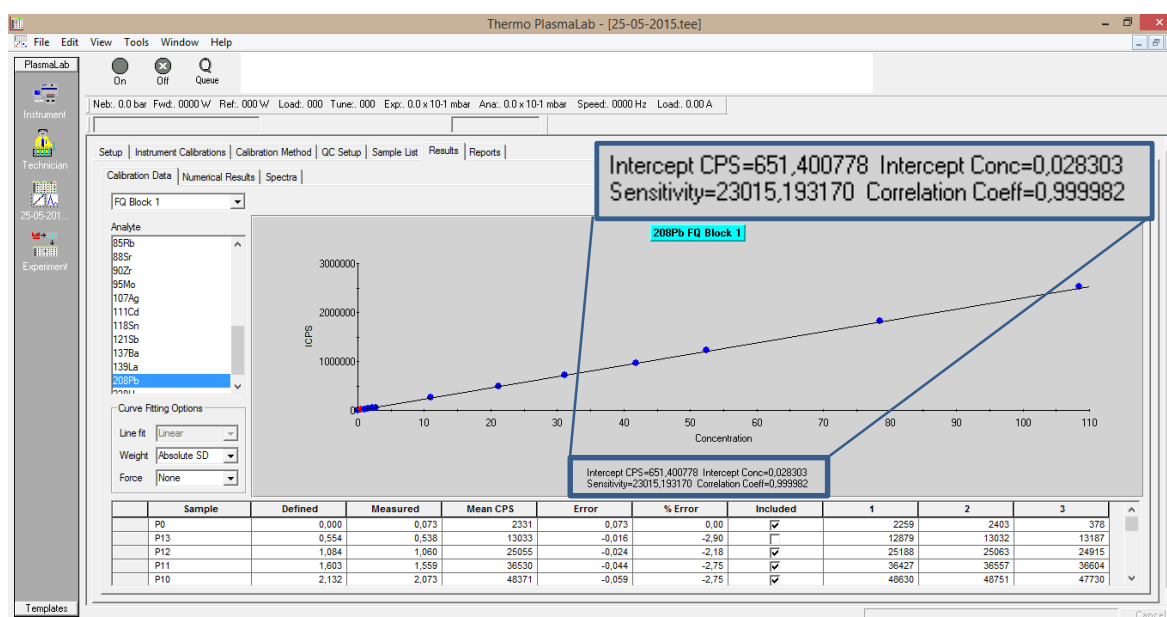
A avaliação da linearidade/ajuste da função de calibração foi realizada numa folha de cálculo do *Microsoft Excel*. Como exemplo, na secção de Anexos (**Tabela 45**) são apresentados de forma detalhada os cálculos realizados na avaliação de uma das funções de calibração obtidas para a quantificação de Pb por ICP-MS (análise de 25/05/2015).

Na **Tabela 27** são apresentados os resultados obtidos no cálculo de dois modelos lineares, linear e quadrática (para a aplicação do teste de Mandel), com os dados da **Tabela 45**.

**Tabela 27 – Resultados obtidos no cálculo dos modelos linear e quadrático de calibração na análise de Pb por CIP-MS de 25/05/2015**

Parâmetros	Modelos pesados		Parâmetros	Modelos pesados	
	Linear	Quadrático		Linear	Quadrático
$n$	12	12	$S_{wfy}$		6,05E+07
$k_i$	3	3	$S_{wy}$	2,30E+07	
$\Sigma k_i$	3,40E+01	34	$\Delta$		3,00E+06
$x^2_{w,m}$		4,63E+00	$s_{wy}$	1,52E+03	1,34E+03
$x_{w,m}$	1,07E+00	1,07E+00	$m_w$ (ou $a_w$ )	<b>23015</b>	<b>9,72</b>
$y_{w,m}$	2,52E+04	2,52E+04	$b_w$	<b>651</b>	<b>22412,05</b>
$S_{wxx}$	4,19E+01	4,19E+01	$c_w$		<b>1249,62</b>
$S_{wyy}$	2,22E+10		$\Delta m_w$ ou $\Delta a_w$	522	
$S_{wfx}$		2,60E+03	$\Delta b_w$	46	
$S_{wff}$		2,33E+05	$\Delta c_w$		
$S_{wxy}$	9,64E+05	9,64E+05	$r$	0,999982	0,999998

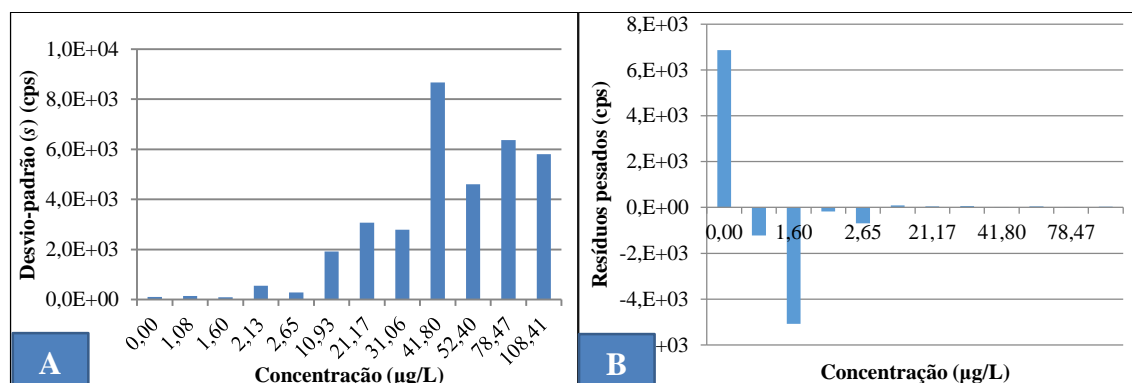
Na **Figura 61** é apresentada a função de calibração linear definida pelo *PlasmaLab* na análise de Pb por ICP-MS realizada a 25/05/2015. Verifica-se que os valores de declive ( $m_w$ ), ordenada na origem ( $b_w$ ) e coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) indicados nessa figura correspondem aos valores obtidos com a folha de cálculo do *Microsoft Excel* (**Tabela 27**), o que valida esses resultados.



**Figura 61 – Função de calibração (linear) obtida na análise de Pb por ICP-MS a 25/05/2015**

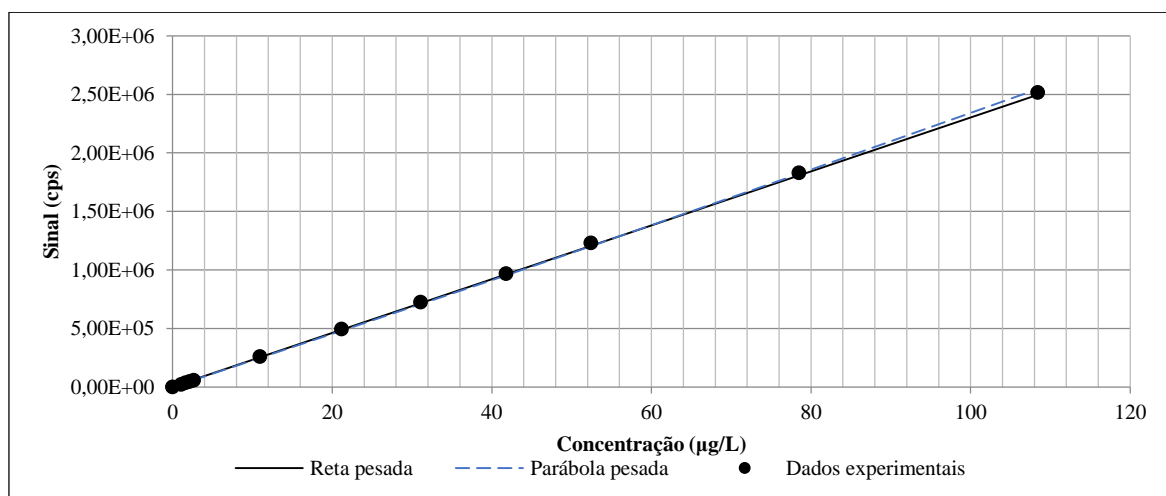
Na **Figura 62**, são apresentados os desvios-padrão das leituras de sinal analítico que definem o “peso” de cada padrão de calibração e os respetivos resíduos. Verifica-se que o desvio-padrão aumenta com o aumento da concentração, o que demonstra a heterocedasticidade da resposta instrumental na gama de trabalho considerada e justifica a aplicação de modelos pesados de calibração. No gráfico dos resíduos pesados verifica-se

uma aparente distribuição não aleatória dos resíduos. O número de sequências positivas e negativas (3 sequências) e o número de resíduos positivos ( $P=8$ ) e negativos ( $N=4$ ) obtidos neste caso não permitem a aplicação do teste de Wald-Wolfowitz para avaliar a aleatoriedade da distribuição (Miller *et al.* 2010). Contudo, intuitivamente, pode-se considerar que o gráfico dos resíduos pesados demonstra uma distribuição não aleatória desses resíduos, pois é obtido um resíduo positivo, seguido de uma sequência de quatro resíduos negativos, que, por sua vez, são sucedidos por sete resíduos positivos.



**Figura 62 – Análise de Pb por ICP-MS dos padrões de calibração (25/05/2015); A:** Desvio-padrão das leituras do sinal analítico, em condições de repetibilidade; **B:** Gráfico dos resíduos pesados.

A inspeção visual da **Figura 63** remete para uma diferença pouco significativa no ajuste dos dados com os modelos pesados linear ou quadrático, uma vez que as linhas que representam cada um desses modelos estão praticamente sobrepostas. Portanto, embora a aparente distribuição não aleatória dos resíduos verificada na **Figura 62** seja indicativa da não linearidade da variação da resposta instrumental em função da concentração do analito, o gráfico apresentado na **Figura 63** contraria essa hipótese.



**Figura 63 – Representação gráfica das funções de calibração obtidas com os modelos pesados linear e quadrático, para o ajuste aos dados obtidos na análise de Pb por ICP-MS de 25/05/2015**



Para complementar a avaliação da falta de ajuste/linearidade por inspeção visual dos gráficos apresentados anteriormente, na **Tabela 28** são apresentados os resultados dos vários testes de hipóteses aplicados neste trabalho para avaliar os modelos de calibração. Para avaliar a homogeneidade da variância associada à quantificação ao longo da gama de trabalho, aplicou-se um teste  $F$ . Este teste confirmou a heterocedasticidade de resultados demonstrada no gráfico A da **Figura 62**. A aplicação de um teste  $t$  na análise do valor de  $r$  indica que existe uma correlação linear significativa da resposta instrumental em função da concentração de Pb. Por fim, os resultados da aplicação do teste  $\chi^2$  e da “ANOVA pesada” indicam que o modelo linear pesado possui falta de ajuste significativo aos dados experimentais. O teste de Mandel contraria a conclusão obtida com o teste  $\chi^2$  e a “ANOVA pesada”, concluindo-se, com base nesse teste, que os desvios-padrão residuais associados aos modelos pesado linear ( $s_{wy,2}$ ) e quadrático ( $s_{wy,3}$ ) não são significativamente diferentes (para um nível de confiança de 95%) e, portanto, o modelo linear constitui uma boa representação da resposta instrumental em função da concentração de Pb (**Tabela 28**).

Tabela 28 – Testes estatísticos aplicados na avaliação do ajuste/linearidade da função de calibração obtida para o Pb na análise por ICP-MS de 25/05/2015

Teste $t$ ao coeficiente de correlação ( $r$ )		Teste $\chi^2$ (chi-quadrado)	
$t_{calc}$	5,27E+02	$\chi^2_{calc}$	5,78E+07
$t_{crít}$	2,23E+00	$\chi^2_{crít}$ ou $F_{crít}$	4,86E+01
<b>Conclusão:</b>	Correlação linear	<b>Conclusão:</b>	Mod. desajustado
Homocedasticidade ( $F$ )		Teste de Mandel ( $F$ )	
$s_i$ máx.	8,66E+03	$s_{wy,2}$	1,52E+03
$s_i$ mín.	9,15E+01	$s_{wy,3}$	1,34E+03
$F_{calc}$	8,96E+03	$F_{calc}$	3,75E+00
$F_{crít}$	1,90E+01	$F_{crít}$	5,12E+00
<b>Conclusão:</b>	Heterocedasticidade	<b>Conclusão:</b>	Linearidade
ANOVA "pesada" ( $F$ )			
	Mod. Linear	Mod. quad.	
$F_{calc}$	1,36E+02	1,29E+02	
$F_{crít}$	2,15E+00	2,20E+00	
<b>Conclusão:</b>	Mod. desajustado	Mod. desajustado	

Como no LCA são usados modelos de calibração pesados, são normalmente analisados mais padrões com concentrações na zona inferior da gama de trabalho, o que resulta numa distribuição não uniforme de pontos ao longo dessa gama. Esse foi o procedimento adotado neste trabalho, mas poderá não ser a estratégia de calibração mais adequada. O efeito combinado do maior número de padrões na zona inferior da gama de

trabalho e a menor variância associadas às réplicas de leitura do sinal analítico desses padrões implicam um peso excessivo na definição da função de calibração. Esse efeito e a maior variância associada às leituras dos padrões de maior concentração promovem um maior afastamento dos pontos correspondentes aos padrões de concentração mais elevada relativamente ao sinal previsto pelo modelo linear. Esse fenómeno explica o facto de, ao proceder à representação gráfica apresentada na **Figura 63** na análise das várias funções de calibração obtidas, se ter verificado frequentemente uma menor sobreposição entre os modelos linear e quadrático na zona de maiores concentrações da gama de trabalho

Assim, a explicação que é proposta neste trabalho para a contradição verificada na aplicação do teste de falta de ajuste com uma “ANOVA pesada” e do teste de Mandel é a distribuição não uniforme dos pontos com os quais é realizada a interpolação do modelo matemático de calibração. De notar que a avaliação da falta de ajuste com a “ANOVA pesada” é realizada apenas com os dados referentes a um modelo de calibração, enquanto no teste de Mandel são comparados dois modelos matemáticos (linear e quadrático) que são obtidos a partir do mesmo conjunto de dados. Assim, o efeito da distribuição dos padrões ao longo da gama de trabalho manifestar-se-á em ambos os modelos de calibração. Portanto, pode-se considerar que o teste de Mandel é mais robusto quanto à influência da distribuição dos dados considerados para a interpolação da função de calibração.

Considerando apenas os resultados da aplicação do teste de Mandel aos dados obtidos nas várias calibrações realizadas, conclui-se que o modelo linear descreve de forma adequada a resposta instrumental do equipamento de ICP-MS na gama de trabalho considerada para a quantificação de Pb em cabelo.

Como oportunidade de melhoria, propõe-se que os procedimentos internos do LCA sejam revistos, para que passem a ser usados conjuntos de padrões que permitam uma distribuição equidistante dos padrões/pontos que definem a função de calibração, o que permitirá uma avaliação mais adequada da linearidade desse modelo matemático.

- **Limite de deteção e limite de quantificação**

A validação do LQ definido foi efetuada recorrendo à análise de brancos e do PVLQ. Na **Figura 64** e na **Figura 65** são apresentadas as cartas de controlo dos valores absolutos das concentrações de Pb calculadas na análise dos brancos de calibração e de digestão por ICP-MS.

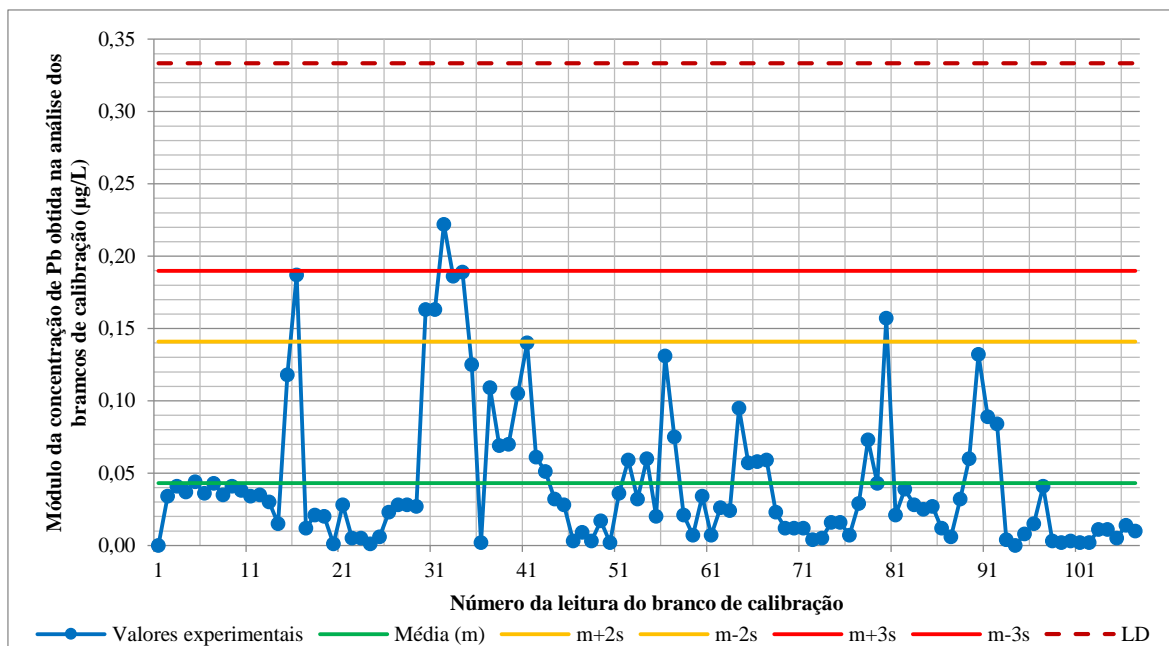


Figura 64 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Pb obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de calibração

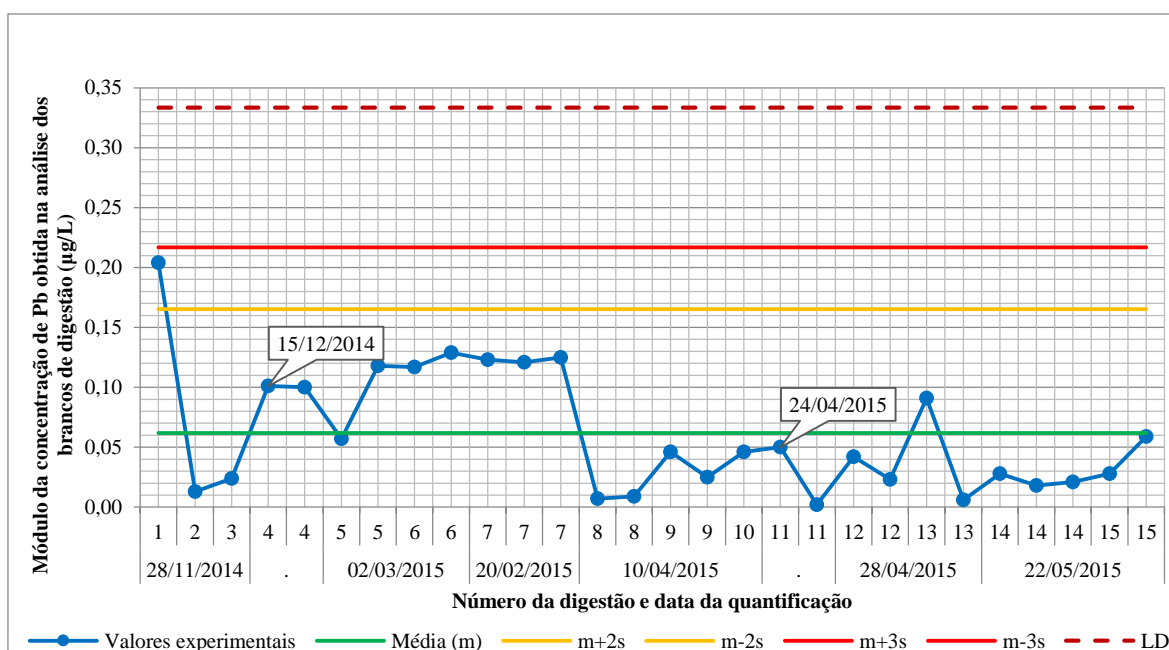


Figura 65 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Pb obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de digestão

Ao avaliar as cartas de controlo apresentadas na **Figura 64** e na **Figura 65** consta-se que a linha média aproxima-se do valor ideal de concentração nula. Para além disso, todos os valores representados encontram-se abaixo da linha que define o LD ( $0,33 \mu\text{g/L}$ ). Assim, conclui-se que o LD e LQ definidos são válidos, pois verificou-se que, tanto na análise dos brancos de calibração, como nos brancos de digestão, foram obtidas concentrações inferiores

ao LD, cumprindo o requisito definido. Assim, com base neste histórico, podemos inferir que, se os valores futuramente obtidos para os brancos continuarem a ser inferiores ao limite de detecção estipulado, o laboratório deverá ponderar a redefinição do LD e do LQ para valores inferiores.

O LD e o LQ podem ainda ser calculados recorrendo às fórmulas apresentadas no Guia 13 da RELACRE (RELACRE 2000), que são indicadas na **Tabela 29**. De notar que, nessa tabela,  $C_0$  corresponde à concentração média obtida na leitura dos brancos e  $s_0$  corresponde ao desvio-padrão associado a essa concentração média. Os valores dessas duas variáveis são obtidos a partir das cartas de controlo dos brancos.

**Tabela 29** – Cálculo do LD e do LQ para a quantificação de Pb por ICP-MS, de acordo com o procedimento indicado no Guia 13 da RELACRE (RELACRE 2000)

Limiares analíticos	Fórmulas de cálculo	Cálculos do LD e do LQ	
		Brancos de calibração	Brancos de digestão
<b>LD</b>	$LD = C_0 + 3s_0$ Equação 63	$0,04 + 3 \times 0,05 \approx 0,2 \mu g/L$	$0,06 + 3 \times 0,05 \approx 0,2 \mu g/L$
<b>LQ</b>	$LQ = C_0 + 10s_0$ Equação 64	$0,04 + 10 \times 0,05 \approx 0,5 \mu g/L$	$0,06 + 10 \times 0,05 \approx 0,6 \mu g/L$

A semelhança nos resultados obtidos pelos dois métodos de cálculo do LD e LQ apresentados na **Tabela 29** confirmam a validade dos LD e do LQ definidos neste trabalho.

Na **Figura 66**, é apresentada a carta de controlo das recuperações obtidas na análise do PVLQ. Verifica-se que a linha média está próxima do valor ideal de 100%, embora exista uma tendência, como pode ser observado a partir da **Figura 66**, uma vez que os pontos correspondente a cada um dos dias de análise apresentam uma tendência para se distribuírem consecutivamente acima ou abaixo da linha média. Apesar disso, todos os resultados estão contidos no intervalo de recuperação de 90 a 110%, que corresponde ao requisito definido inicialmente para a análise dessa solução. Tendo em conta que a zona próxima do LQ é a zona da gama de trabalho em que o sinal do analito é menor, correspondendo portanto a uma zona de quantificação mais difícil, podemos considerar que os valores obtidos apresentam a qualidade exigida.

Em suma, considerando a análise de brancos e do PVLQ conclui-se que o LD e LQ definidos para a quantificação por ICP-MS de Pb em cabelo são válidos.

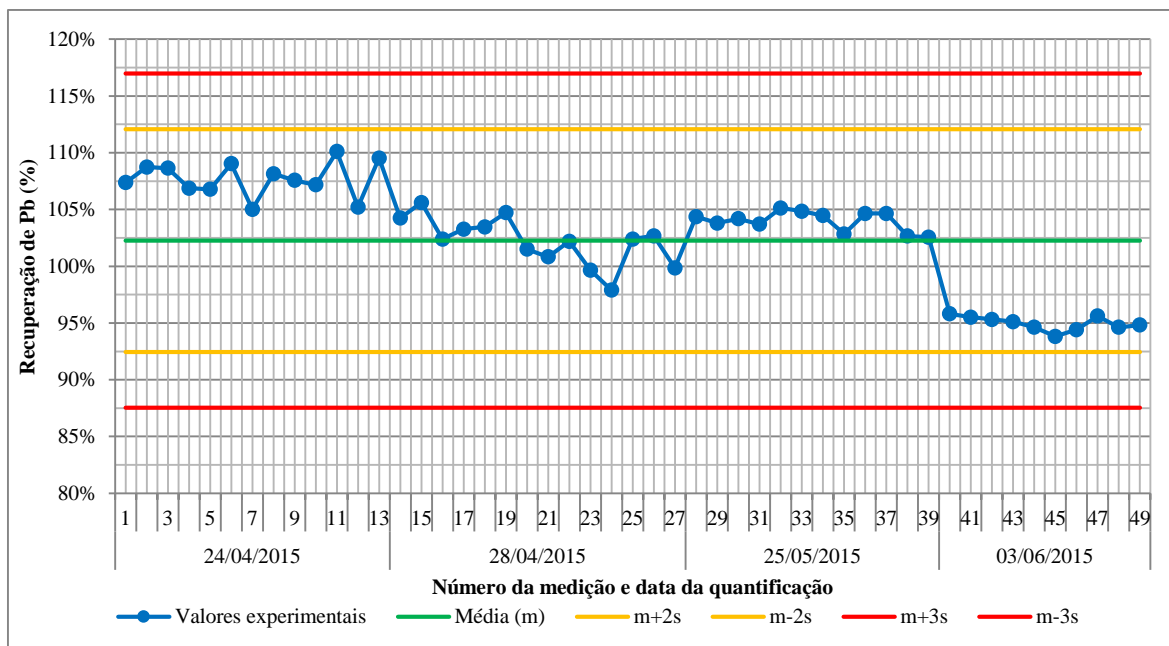


Figura 66 – Carta de controle para a recuperação de Pb (relativamente à concentração de referência de  $\approx 1 \mu\text{g/L}$ ) na análise por ICP-MS do PVLQ

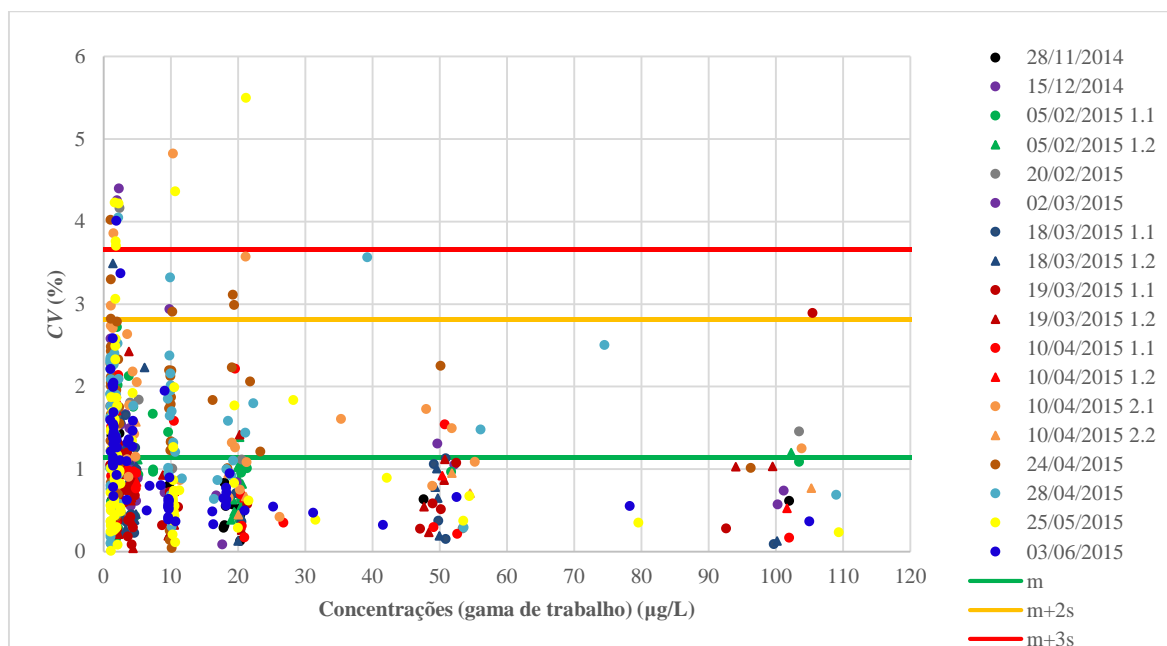
- **Precisão**

- **Desvio-padrão relativo das leituras realizadas durante a aspiração da solução**

Na **Figura 67**, estão representados graficamente os coeficientes de variação (de repetibilidade) obtidos na quantificação de Pb nas várias soluções com o equipamento de ICP-MS. Esses valores representam o desvio-padrão relativo das concentrações calculadas a partir das três réplicas de leitura realizadas em cada aspiração de solução pelo equipamento de ICP-MS. Como requisito inicial para esta característica de desempenho da técnica instrumental, foi definido que esse parâmetro deveria ser  $\leq 10\%$ , tendo por base na definição desse critério a experiência do LCA na análise de Pb por ICP-MS em diversas matrizes. De facto, verificou-se que foram obtidos valores para esse parâmetro inferiores a esse requisito.

Na **Figura 67**, verifica-se que o valor médio do desvio-padrão relativo é de  $\approx 1,1\%$  e que as linhas de aviso e de ação correspondem, respetivamente, a  $2,8\%$  e a  $3,7\%$ . Na zona próxima do LQ existe um maior número de pontos acima desses limites. Esta observação é expectável, pois normalmente a precisão diminui à medida que a concentração do analito diminui. O máximo obtido para esse parâmetro foi de aproximadamente  $5,5\%$ . Com base nos resultados apresentados, o requisito de aceitação para o desvio-padrão relativo foi redefinido para  $6\%$ , pois todos os resultados representados são inferiores a esse valor. Contudo, considerando o controlo de qualidade aplicado na utilização em rotina do sistema analítico avaliado, poderá ser mais adequado estabelecer como requisito para este parâmetro

o valor máximo de aproximadamente 4%, pois esse valor está próximo da linha ação no gráfico da **Figura 67** (97,6% dos resultados válidos). Como se verifica que a maioria dos pontos que ultrapassam esse limite correspondem à zona próxima do LQ, também poderá ser adequado estabelecer dois requisitos para esta característica de desempenho do sistema analítico: um para a gama de concentrações mais alta e outro mais elevado na zona de concentrações próxima do LQ.



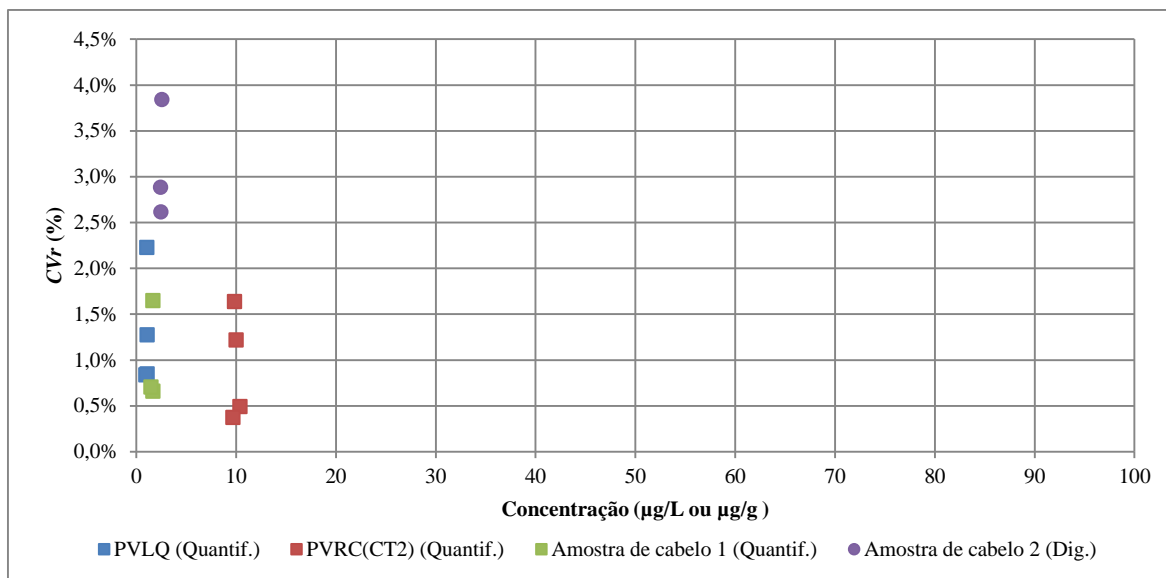
**Figura 67** – Coeficiente variação (desvio-padrão relativo) obtido nas três réplicas de leitura realizadas na análise de Pb por ICP-MS

#### ○ Repetibilidade

Na **Figura 68**, são representados graficamente os coeficientes de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) obtidos nas análises válidas das várias soluções com diferentes concentrações de Pb. Foram consideradas diferentes condições de repetibilidade, de modo a avaliar a variação associada à quantificação por ICP-MS (pontos representados por quadrados) e ao processo de digestão (pontos representados por círculos).

A repetibilidade da leitura instrumental foi avaliada recorrendo à análise de dois padrões de verificação (PVLQ e PVFC(CT2)) e uma amostra real de cabelo. Cada uma dessas soluções foi analisadas 10 vezes consecutivas, sendo cada uma dessas análises intercalada pela aspiração da solução de lavagem do equipamento. Cada um dos pontos apresentados corresponde ao  $CV_r$  obtido num dia de análise.

A repetibilidade associada à digestão foi avaliada através da digestão de um total de 30 porções de uma mesma amostra de cabelo, em 3 ciclos de digestão independentes.



**Figura 68 – Coeficientes de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) associados à quantificação de Pb por ICP-MS em várias soluções. “Quantif.”: Desvio-padrão relativo de 10 réplicas de leitura da concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) de Pb numa mesma solução aspirada repetidamente (aspirações da solução de teste intercaladas com aspiração da solução de lavagem); “Dig.”: Desvio-padrão relativo da leitura da concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) de 10 réplicas de digestão (aspiração sucessivas de soluções de várias porções de uma amostra de cabelo digerido num único ciclo de digestão)**

Ao comparar os valores de  $CV_r$  associados à leitura instrumental e à digestão, verifica-se que são obtidos valores de  $CV_r$  superiores na avaliação da repetibilidade da digestão, pois na **Figura 68** os pontos representados por círculos a roxo encontram-se acima dos restantes. A avaliação da repetibilidade da digestão depende de leitura instrumental. Portanto, os valores de  $CV_r$  obtidos a partir das concentrações calculadas para as várias porções da amostra de cabelo digeridas são afetados por dois tipos de repetibilidade, que contribuem para a variabilidade dos resultados: a repetibilidade associada ao processo de digestão e a repetibilidade associada à leitura instrumental. Assim, é previsível que sejam obtidos valores superiores ao que se verifica quando o fator avaliado é apenas a repetibilidade da leitura instrumental.

De acordo com o representado na **Figura 68**, a repetibilidade do processo foi avaliada apenas na gama de concentrações entre 1 e 10  $\mu\text{g/L}$ , sendo que a gama de trabalho definida corresponde a 1-100  $\mu\text{g/L}$  ( $\mu\text{g/g}$ , considerando a concentração no cabelo). Assim, como trabalho futuro, a repetibilidade deverá ser também avaliada para valores superiores de concentração, de modo a abranger toda a gama de trabalho. Contudo, como a avaliação da repetibilidade foi realizada na zona de mais baixas concentrações da gama de trabalho, será expectável que a repetibilidade estimada para concentrações superiores seja inferior à obtida neste trabalho. Também é necessário ter em consideração que a repetibilidade foi avaliada

com um histórico ainda reduzido de determinações e, portanto, os valores determinados para  $CV_r$  constituem apenas referências, sendo necessário realizar mais determinações para obter uma estimativa mais robusta da repetibilidade associada ao método.

A avaliação da repetibilidade foi também realizada recorrendo à análise de duplicados, pois esse é o número de réplicas típico quando o sistema analítico é aplicado em rotina. Neste contexto, foram traçadas cartas de controlo para a diferença relativa entre leituras em duplicado da mesma solução (avaliação da repetibilidade da leitura instrumental) e de soluções independentes correspondentes a réplicas de digestão (avaliação da variabilidade conjunta associada à repetibilidade da digestão e da leitura instrumental). Essas cartas de controlo são apresentadas na **Figura 69** e na **Figura 70**. Nestes gráficos, verifica-se que a amplitude dos limites definidos na carta de controlo dos duplicados de leitura (**Figura 69**) é inferior ao que se verifica na carta de controlo de duplicados de digestão (**Figura 70**), o que seria expectável. A maior amplitude no segundo caso é justificada pelo fato dos duplicados de digestão implicarem um maior número de etapas do sistema analítico, cada uma das quais contribui para um aumento da variabilidade.

Os requisitos definidos para a diferença relativa entre os duplicados para efeitos de validação foram de 5% e 10% para os duplicados de leitura e de digestão, respetivamente. Para os duplicados de leitura foi obtida uma diferença relativa máxima de 4,2%, enquanto para os duplicados de digestão esse valor é 9,7%, verificando-se, portanto, o cumprimento dos critérios definidos. Assim, conclui-se que o sistema analítico possui um desempenho satisfatório relativamente à repetibilidade. Contudo, tendo em conta os intervalos definidos pelas linhas de aviso, na aplicação futura do sistema analítico em rotina poderá ser mais adequado redefinir como requisitos valores de diferença relativa máxima de 3% para os duplicados de leitura e 7% para os duplicados de digestão.



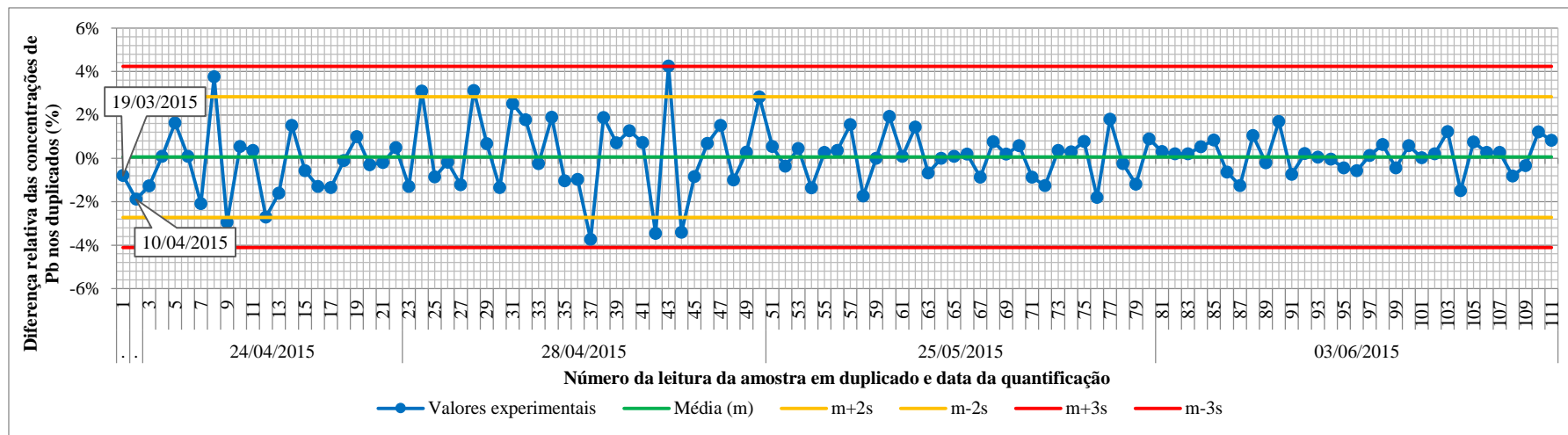


Figura 69 – Carta de controle para a diferença relativa entre duplicados de leitura da concentração de Pb obtida na análise por ICP-MS, em condições de repetibilidade (leituras consecutivas da mesma solução, intercaladas por aspiração da solução de lavagem do equipamento)

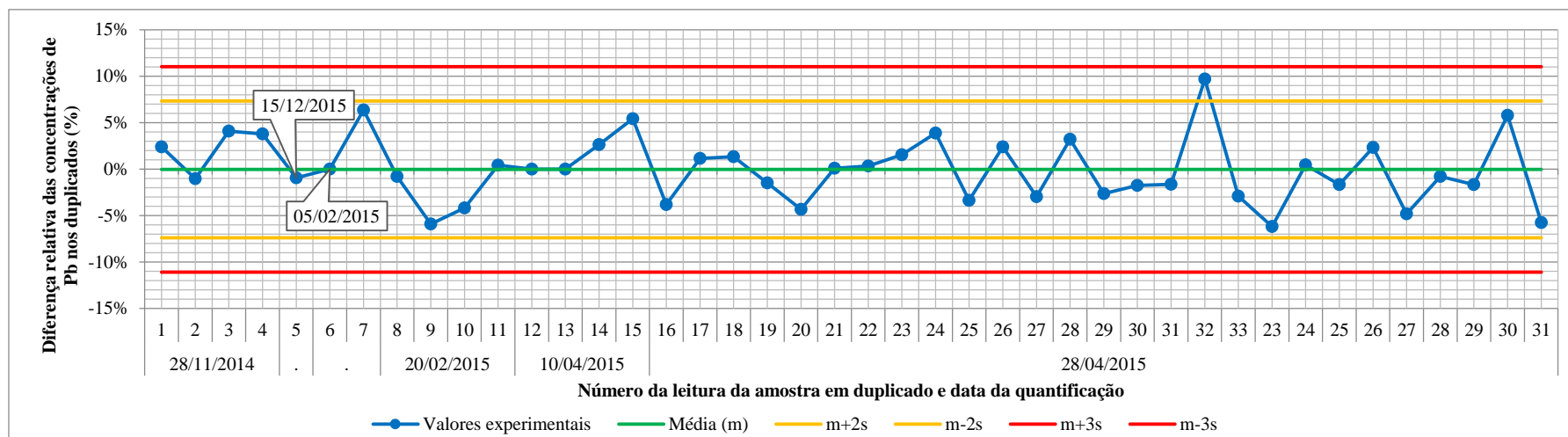


Figura 70 – Carta de controle para a diferença relativa entre as concentrações de Pb obtidas na análise por ICP-MS de duplicados de digestão, em condições de repetibilidade

○ **Precisão intermédia**

Para a avaliação da precisão intermédia foram usadas várias soluções: o PVLQ, o PVFC(CT2) e soluções de cabelo digerido. No caso dos padrões aquosos (PVLQ e PVFC(CT2)), a estimativa da precisão intermédia reflete dois fatores de variação: o dia de análise e a preparação do padrão.

O valor máximo obtido para o coeficiente de variação associado à precisão intermédia foi obtido a partir da análise efetuada em três dias independentes de uma amostra real de cabelo digerida, obtendo-se o conjunto de dados apresentados na **Tabela 30**. Recorrendo ao *software Microsoft EXCEL*, foi aplicado um teste ANOVA a uma dimensão, obtendo-se os resultados apresentados na **Tabela 31**.

**Tabela 30** – Dados obtidos na análise de Pb por ICP-MS de uma amostra real de cabelo digerida em três dias de análise

Análise	Dias de análise			
	28/04/2015	25/05/2015	03/06/2015	
1	1,65	1,66	1,48	
2	1,65	1,68	1,48	
3	1,62	1,67	1,46	
4	1,64	1,67	1,48	
5	1,65	1,66	1,47	
6	1,72	1,69	1,47	
7	1,69	1,66	1,46	
8	1,67	1,66	1,48	
9	1,65	1,68	1,48	
10	1,64	1,66	1,46	
n	10	10	10	Global
Média	1,66	1,67	1,47	1,60

**Tabela 31** – Tabela obtida após aplicação do teste ANOVA unidimensional aos dados apresentados na Tabela 30

Teste ANOVA unidimensional						
Fonte de variação	SQ	Graus de liberdade	MQ	$F_{calc}$	Valor-p	$F_{crit}$
Entre grupos	0,240738	2	0,120369	384,82	1,43E-20	3,35
Residual	0,008445	27	0,000313			
Total	0,249183	29				

A aplicação do seguinte conjunto de cálculo permite estimar a precisão intermédia (e a repetibilidade):

$$S_{repetibilidade} = \sqrt{MQ_{resíduos}} = \sqrt{0,000313} \approx 0,0177$$

$$S_{entre grupos} = \sqrt{\frac{MQ_{entre grupos} - MQ_{resíduos}}{n}} = \sqrt{\frac{0,120369 - 0,000313}{10}} \approx 0,1096$$

$$s_I = \sqrt{s_{\text{repetibilidade}}^2 + s_{\text{entre grupos}}^2} = \sqrt{0,0177^2 + 0,1096^2} = 0,1110$$

O coeficiente de variação associado à precisão intermédia ( $CV_I$ ) é obtido a partir da razão entre o valor determinado para a precisão intermédia ( $s_I$ ) e a média global apresentada na **Tabela 31**, obtendo um uma variação total de  $\approx 6,9\%$ . De notar que os fatores de variabilidade considerados neste caso são a repetibilidade da leitura instrumental e os diferentes dias de análise por ICP-MS. No caso em particular do PVLQ e do PVFC, como foi já referido, existe um fator extra de variabilidade, que está associado à preparação da solução em dias diferentes.

Os resultados obtidos na análise ao longo de vários dias das réplicas de digestão do MRC de cabelo podem ser também usados na aplicação de um teste ANOVA unidimensional. Nesse caso, os resultados obtidos para as várias réplicas de digestão dependem também da repetibilidade da digestão, o que constitui um fator de variabilidade adicional e permite a obtenção de uma estimativa final da precisão intermédia associada ao método mais realista, pois é incluída mais uma etapa do método analítico na avaliação da precisão. O valor máximo de  $CV_I$  obtido nessas condições de precisão foi de 5,1%, que corresponde à análise em 5 dias das 3 réplicas de digestão do MRC GBW 09101b. Na **Tabela 32** são apresentados os dados obtidos nessa análise, que, após a aplicação do teste ANOVA unidimensional geraram os resultados apresentados na **Tabela 33**.

**Tabela 32** – Dados obtidos para a concentração de chumbo no cabelo ( $\mu\text{g/g}$ ) na análise em 4 dias das três réplicas de digestão do MRC GBW 09101b

Dia\Réplica	A1	A2	A3	
05/02/2015	4,32	4,14	4,16	
02/03/2015	4,58	4,40	4,44	
18/03/2015	4,41	4,29	4,34	
19/03/2015	4,11	3,96	3,89	Global
Média	4,44	4,28	4,31	4,34

**Tabela 33** –Tabela obtida após aplicação do teste ANOVA unidimensional aos dados apresentados na Tabela 32

Teste ANOVA unidimensional						
Fonte de variação	SQ	Graus de liberdade	MQ	$F_{\text{calc}}$	Valor-p	$F_{\text{crít}}$
Entre grupos	0,391808	3	0,130603	14,94	1,21E-03	4,07
Residual	0,069917	8	0,008740			
Total	0,461725	11				

A aplicação do conjunto de cálculos referido anteriormente aos dados da **Tabela 33** leva à obtenção de um valor de  $CV_I$  máximo de 5,1%. Seria expectável que o valor obtido para o  $CV_I$ , considerando estas condições de precisão, fosse superior ao máximo obtido

quando não foi considerada a repetibilidade da digestão, tendo em conta que inclui um fator adicional de variabilidade, mas isso não se verifica. Esta estimativa da precisão intermédia foi realizada considerando um número de dias e de réplicas reduzido. Assim, os coeficientes de variação calculados desta forma deverão ser reavaliados considerando um maior histórico de dados, o que permitirá obter estimativas mais robustas desses parâmetros.

Na **Tabela 34**, são compilados os resultados obtidos na avaliação da precisão, aplicando o teste ANOVA unidimensional. Essa tabela permite confirmar que a variação dos dias de análise é, de entre os fatores considerados na avaliação da precisão intermédia, aquele que contribui para uma maior variabilidade dos resultados.

**Tabela 34 – Resultados obtidos na avaliação da precisão recorrendo à aplicação do teste ANOVA unidimensional**

Soluções	Número de dias de análise	Número de réplicas	Concentração média experimental	Coeficiente de variação (desvio-padrão relativo) (%)		
				Repetibilidade	Entre grupos (entre dias)	Precisão intermédia
PVLQ	4	10	1,05 µg/L	1,2	6,5	6,6
PVFC	4	10	9,98 µg/L	1,1	3,0	3,2
Amostra real	3	10	1,60 µg/g	1,1	6,9	6,9
Digestão 1 (€)	3	3	2,24 µg/g	1,4	2,5	2,9
Digestão 2 (€)	3	3	2,26 µg/g	2,9	3,3	4,4
Digestão 4 (€)	2	5	2,25 µg/g	1,7	3,8	4,2
Digestão 5 (¥)	3	4	4,55 µg/g	4,3	2,0	4,7
Digestão 7 (€)	3	4	2,20 µg/g	2,6	4,0	4,8
Digestão 7 (¥)	3	4	4,34 µg/g	2,2	4,6	5,1
Máximo	-		-	4,3	6,9	6,9

### Justeza

#### ○ Digestão de MRC de cabelo

A justeza associada às etapas de digestão e quantificação foi avaliada recorrendo à análise de MRC de cabelo. Com base nesses resultados foram contruídas cartas de controlo da percentagem de recuperação obtida, i.e. da razão entre a concentração obtida experimentalmente e a concentração que consta no certificado de análise do MRC. As cartas de controlo para cada um dos MRC foram construídas considerando dois conjuntos de dados. Numa primeira fase, foi considerada a primeira análise válida realizada ao MRC, com o objetivo de avaliar a justeza. Foram depois elaboradas cartas de controlo com os resultados obtidos em todas as análises dos MRC que permite, para além de avaliar a justeza, avaliar a precisão intermédia associada não só à realização de diferentes digestões, mas também à análise por ICP-MS em vários dias. Esse tipo de carta de controlo global acaba por constituir também uma forma de avaliar a estabilidade das soluções de cabelo digerido.

Na **Figura 71** e na **Figura 72** são apresentadas as cartas de controlo referentes à primeira análise válida de cada um dos MRC. As cartas de controlo globais, em que são compilados os resultados de todas as análises às soluções de MRC de cabelo digerido são apresentadas na **Figura 73** e na **Figura 74**.

A carta de controlo da **Figura 71** evidencia uma tendência não-aleatória na distribuição dos pontos representados, pois é obtido um primeiro conjunto de 8 pontos consecutivos que se encontram acima da linha média, seguido de um conjunto de 5 pontos que se encontram abaixo dessa linha. Apesar disso, todos os valores obtidos encontram-se dentro dos limites definidos pela incerteza na concentração de Pb no MRC e o valor médio de recuperação encontra-se próximo do valor ideal de 100%. Contudo, é mais representativo considerar a recuperação média obtida em todas as análises ao MRC (**Figura 73**) pois o número de pontos/dias de análise é significativamente maior, e, por isso, a influência associada à ocorrência de um erro sistemático num determinado dia é minimizada. Ao analisar a carta de controlo da **Figura 73** verifica-se que a linha média se encontra próxima de 100%, contudo parece existir uma tendência não-aleatória da distribuição dos pontos, no sentido em que são obtidos conjuntos acima e abaixo da linha média em função do dia de análise; verifica-se ainda que todos os pontos se encontram dentro dos limites definidos pelas linhas de ação. A maioria dos valores obtidos encontra-se dentro dos limites definidos por 2 vezes o desvio-padrão dos valores obtidos (linhas a amarelo) e dos limites definidos pela incerteza da concentração de Pb o no MRC (linhas a roxo).

Em suma, considerando as cartas de controlo referentes ao MRC ERM DB001 (**Figura 71** e **Figura 73**) conclui-se que é obtido um erro de justeza reduzido ( $\leq 10\%$ ); portanto, o sistema analítico avaliado é adequado para a quantificação de Pb em cabelo.

Considerando as cartas de controlo referentes ao MRC GBW 09101b (**Figura 72** e **Figura 74**) verifica-se que é obtido um valor médio próximo de 112% (em ambas as cartas de controlo). Portanto, verifica-se neste caso a ocorrência de um erro sistemático significativo, que corresponde a uma diferença na percentagem média de recuperação de  $\approx 10\%$ , relativamente ao que se verificou para o MRC ERM DB001. Esse erro sistemático não é desprezável e reflete-se no facto da maioria dos pontos das cartas de controlo se encontrar acima do limite máximo definido pela incerteza da concentração no MRC. Relativamente à precisão, as diferenças entre os dois MRC não é significativa, uma vez que as amplitudes dos limites das respetivas cartas de controlo são idênticas.

Tendo em conta que o sistema analítico usado para a análise de ambos os MRC foi o mesmo, seria expectável que se o erro sistemático verificado se devesse a alguma das etapas do método usado para a análise, esse erro manifestar-se-ia em ambos os MRC. Como não se verifica a mesma tendência nos dois MRC, conclui-se que o aparente erro sistemático na análise do MRC GBW 09101b dever-se-á às próprias características do MRC. Tendo em conta que o erro sistemático ocorre no sentido positivo, ou seja a concentração determinada de Pb é superior à concentração certificada, poderá ser colocada a hipótese de uma contaminação do próprio MRC GBW 09101b com Pb ou ainda a possível heterogeneidade da amostra, uma vez que se verificou que a granulometria do MRC GBW 09101b é superior à do MRC ERM DB001. Em teoria, ao digerir muitas porções independentes do MRC, a possível influência da heterogeneidade da amostra seria minimizada, mas, considerando a carta de controlo da **Figura 72**, verifica-se que os valores representados resultaram da digestão de 10 porções do MRC, o que constitui ainda um número de amostras analisadas reduzidas. O laboratório deverá adquirir mais valores de análise de MRC, de modo a obter um valor mais robusto para a justeza.

Tendo em conta as hipóteses apresentadas nos parágrafos anteriores, considerou-se que os resultados obtidos análise do MRC ERM DB001 são aqueles que são representativos da justeza associada ao sistema analítico. Contudo, seria importante obter um maior histórico de resultados, e eventualmente usar outro MRC de cabelo para avaliar exaustivamente a justeza associada ao sistema analítico desenvolvido.

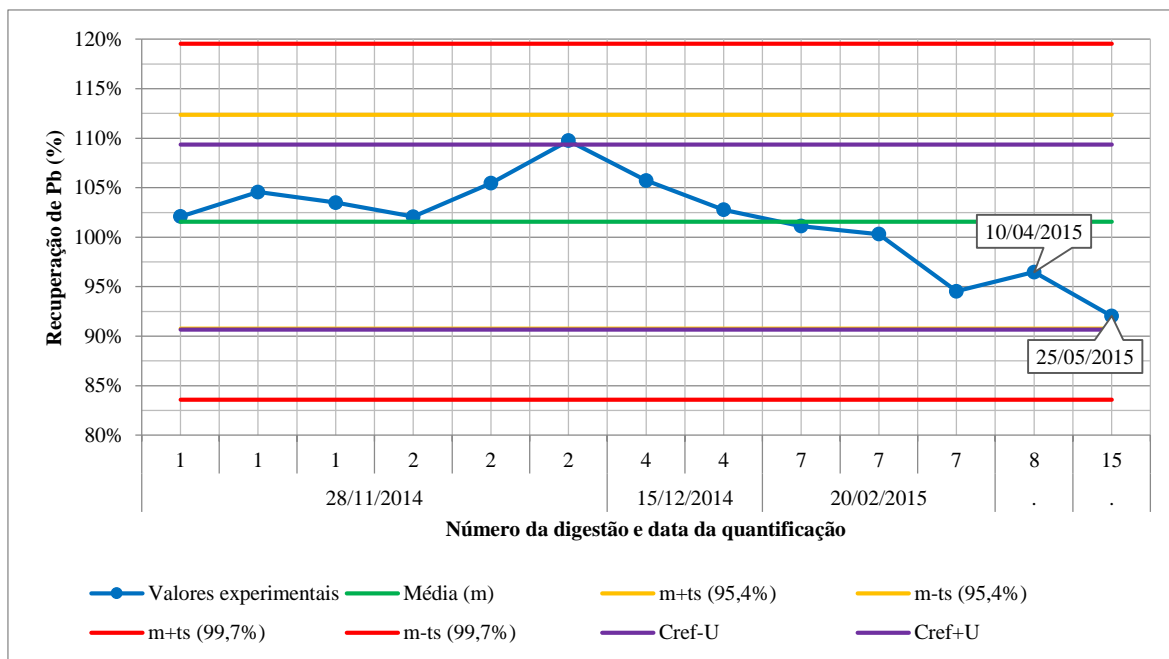


Figura 71 – Carta de controle da recuperação de Pb obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM DB001

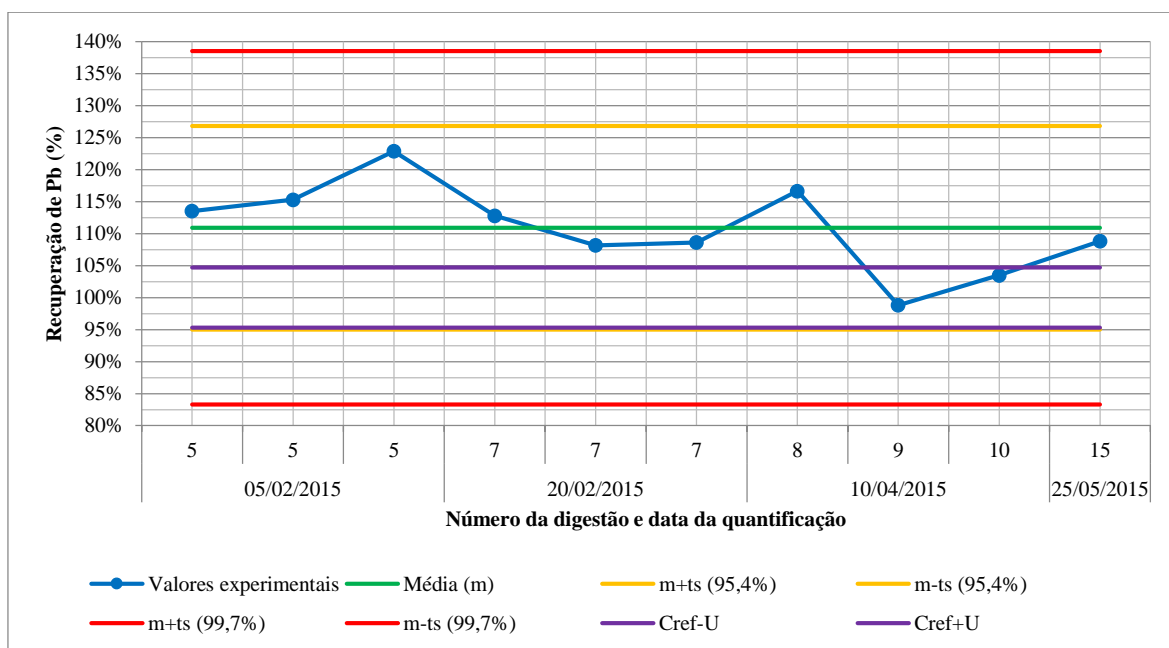


Figura 72 – Carta de controle da recuperação de Pb obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC GBW 09101b

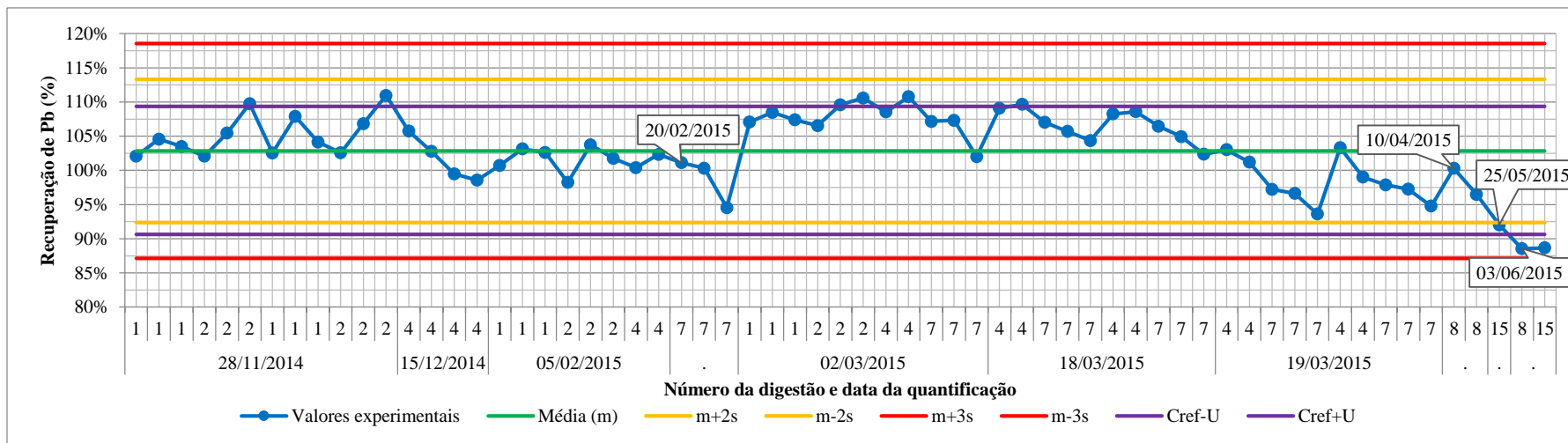


Figura 73 – Carta de controlo da recuperação de Pb obtida em todas as análises válidas por ICP-MS do MRC ERM DB001

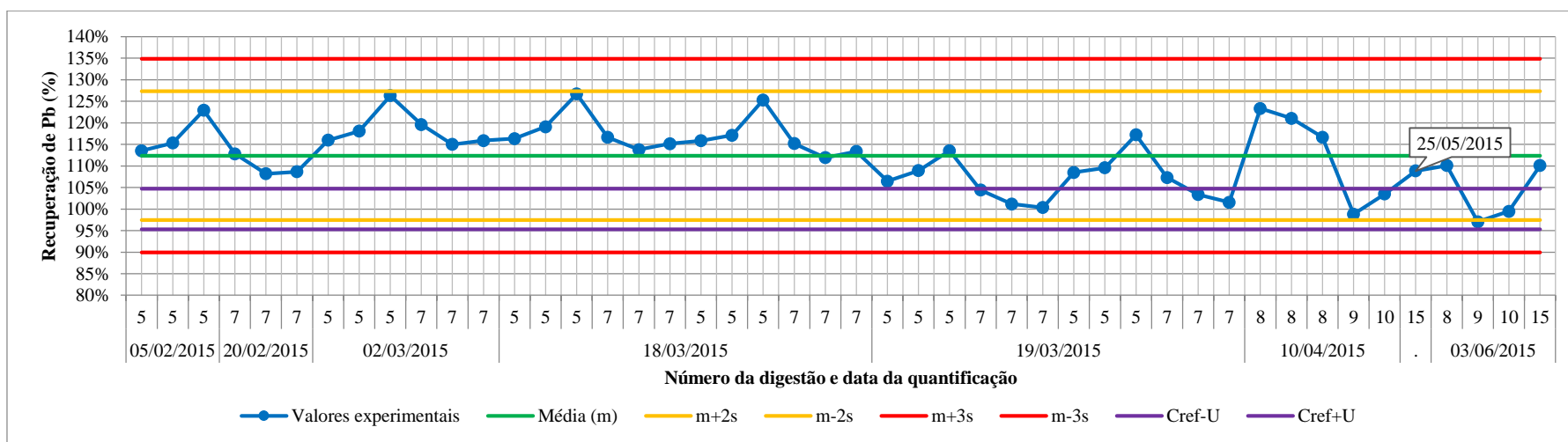
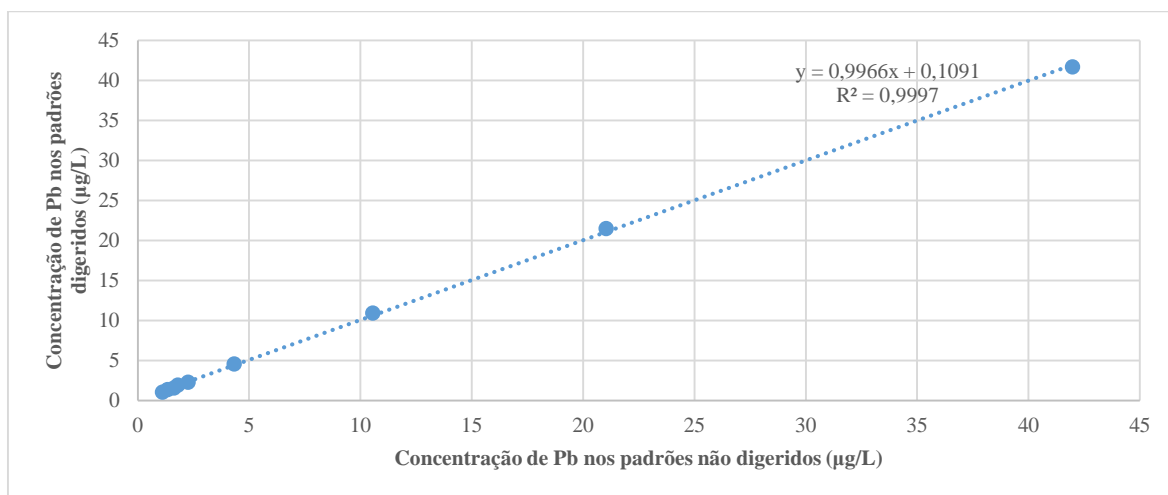


Figura 74 – Carta de controlo da recuperação de Pb obtida em todas as análises válidas por ICP-MS do MRC GBW 09101b



### ○ Digestão de padrões

Como referido anteriormente, o erro de justeza associado à digestão foi também avaliado recorrendo à digestão de soluções-padrão. Foram preparados dois conjuntos de padrões aquosos, tendo sido um desses conjuntos submetido ao método de digestão adotado para a solubilização de cabelo. Os resultados obtidos na análise por ICP-MS dos conjuntos de padrões foram avaliados graficamente (**Figura 75**).



**Figura 75** – Comparação das concentrações de Pb (µg/L) obtidas na análise por ICP-MS dos dois conjuntos de padrões aquosos preparados para avaliação do erro de justeza da digestão

A função representada na **Figura 75** foi obtida recorrendo ao modelo não pesado do método dos mínimos desvios quadrados. Os pontos representados na **Figura 75** estão distribuídos até um máximo de concentração de 40 µg/L, apesar do máximo da gama de trabalho considerada na validação da quantificação de Pb por ICP-MS corresponder a 100 µg/. Optou-se por avaliar a justeza da digestão na zona de concentrações mais baixas da gama de trabalho porque é nessa zona que a possível ocorrência de contaminações ou de perdas de analito tem um efeito maior (e mais negativo) em termos de erro de justeza.

Os intervalos de confiança obtidos para os valores de declive e ordenada na origem da função representada na **Figura 75** são, respetivamente,  $0,996 \pm 0,014$  e  $0,1091 \pm 0,0058$ . Portanto, verifica-se que o intervalo de confiança associado ao declive contém o valor de declive unitário. Contudo o intervalo de confiança da ordenada na origem não contém o zero; esse desvio ao valor ideal da ordenada na origem poderá dever-se à introdução de uma contaminação com Pb no processo de digestão. Apesar disso, considerando o valor da ordenada na origem e que o limite mínimo da gama de trabalho foi definido como 1 µg/L, a contribuição dessa possível contaminação na concentração final calculada não será superior a 10% e, portanto, pode ser considerada como aceitável.

- **Incerteza**

A incerteza associada ao sistema analítico avaliada foi estimada de acordo com o procedimento indicado anteriormente. Como essa estimativa é obtida com base na análise dos MRC de cabelo, a incerteza estimada contempla três das etapas do sistema analítico: a determinação de massa, a digestão e a quantificação por ICP-MS. Os resultados usados na estimativa da incerteza correspondem aos representados nas cartas de controlo apresentadas na **Figura 73** e na **Figura 74**. Na **Tabela 35** é apresentado o resumo dos resultados obtidos na estimativa da incerteza considerando os dois MRC usados neste trabalho.

**Tabela 35** – Tabela-resumo com os resultados obtidos na estimativa da incerteza associada à quantificação de Pb com o sistema analítico usado neste trabalho e com base nos dois MRC de cabelo analisados

Componente da incerteza	Parâmetro	MRC ERM DB001	MRC GBW 09101b
<b>Precisão</b>	Número total de medições válidas	63	46
	Valor médio obtido nas medições experimentais da concentração	2,20	4,30
	Desvio-padrão associado às medições experimentais da concentração	0,11	0,29
	Incerteza-padrão associada à precisão ( $u_{Rw}$ )	5,1%	6,7%
<b>Justeza</b>	Concentração certificada ( $\mu\text{g/g}$ )	2,14	3,83
	Incerteza expandida da concentração certificada ( $U$ )	0,2 ( $k=2$ )	0,18 ( $k=2$ )
	Incerteza associada ao valor de referência	4,7%	2,4%
	<i>Bias</i>	0,06 (2,9%)	0,47 (12,4%)
	Incerteza associada à estimativa do <i>Bias</i>	0,3%	0,3%
	Incerteza-padrão associada à justeza ( $u_b$ )	5,5%	12,6%
<b>Exatidão</b>	Incerteza-padrão combinada ( $u_c$ ) (justeza+precisão $\Rightarrow$ exatidão)	7,5%	14,3%
	<b>Incerteza expandida global (<math>k=2</math>) (<math>U</math>)</b>	<b>15,0%</b>	<b>28,6%</b>
<b>Testes estatísticos à incerteza estimada</b>	Erro normalizado ( $E_n$ )	0,2	0,4
	Valor calculado para $t$ ( $t_{\text{calc}}$ )	0,4	0,9
	Valor de $t$ tabelado ( $t_{\text{tab}}$ )	1,7	1,7

Os dados na **Tabela 35** demonstram que estimativa da incerteza obtida ao usar o MRC GBW 09101b é consideravelmente superior à estimada com base nas análises do MRC ERM DB001. Uma possível explicação para essa diferença poderá ser o facto da concentração de Pb nos dois MRC ser diferente, pois a concentração de Pb no MRC GBW 09101b é quase o dobro da do MRC MRC ERM DB001. Contudo, uma vez que a concentração de Pb no MRC ERM DB001 está mais próxima do LQ, seria expectável que fosse este MRC a originar uma maior incerteza, o que não se verifica. Ao avaliar as várias componentes de incerteza calculadas, verifica-se que a incerteza associada ao erro sistemático é muito superior para o MRC GBW 09101b, relativamente ao que se verifica

para o MRC ERM DB001. Na avaliação da justeza foram apresentadas algumas possíveis justificações para essa ocorrência, considerando-se que o erro sistemático verificado se deverá provavelmente às características do próprio MRC e não ao sistema analítico estudado. Por esse motivo, considerou-se neste caso que a incerteza associada ao sistema analítico avaliado corresponde à incerteza estimada através do MRC ERM DB001. Esta opção é ainda sustentada pelos resultados obtidos nos testes de recuperação e na avaliação da precisão, os quais definem intervalos que estão mais próximos do previsto pela incerteza estimada recorrendo ao MRC ERM DB001.

Os valores de  $E_n$  e  $t_{calc}$  indicados na **Tabela 35** são, respetivamente, inferiores a 1 (valor de referência) e 1,7 ( $t$  tabelado). Assim, conclui-se que o intervalo definido pelo valor médio obtido na análise de Pb no MRC ERM DB001 e o respetivo valor estimado para a incerteza expandida contém o valor certificado de concentração, o que constitui uma indicação de que foi obtida uma estimativa adequada da incerteza.

#### **4.2.3. Resumo, comparação e interpretação dos resultados obtidos na validação**

Os requisitos considerados e os resultados obtidos na avaliação das várias características de desempenho do sistema analítico na validação da quantificação de Pb, Cu e Zn em cabelo por ICP-MS são apresentados, respetivamente, na **Tabela 37**, **Tabela 38** e **Tabela 39**. Os dados em que se baseiam os resultados apresentados nas tabelas referentes às análises de Cu e Zn são apresentados na secção de Anexos. A análise da informação apresentada nas três tabelas referidas permite comparar o desempenho do sistema analítico na quantificação por ICP-MS da concentração de Cu, Zn e Pb no cabelo.

Tendo em conta que a definição dos requisitos para a validação é influenciada pela estimativa da incerteza associada à quantificação com o sistema analítico desenvolvido, é útil iniciar a comparação dos resultados obtidos para os três elementos com a análise das respetivas estimativas da incerteza. Verifica-se que o analito que apresenta uma estimativa menor da incerteza é o Pb, correspondendo a um valor relativo de 15,0%, enquanto na análise de Cu e Zn foram obtidos os valores máximos de 18,9% e 18,0%, respetivamente. Todos esses valores de incerteza foram estimados com base na análise do MRC ERM DB001. Uma possível explicação para a menor incerteza na quantificação de Pb, comparativamente ao que se verifica na análise de Cu e Zn, é a maior sensibilidade do equipamento para a quantificação deste elemento, como é demonstrado pela comparação dos valores referentes ao declive das funções de calibração.

Considerando os resultados obtidos na aplicação do teste de Mandel, conclui-se que o modelo linear pesado descreve de forma adequada a resposta instrumental do equipamento de ICP-MS na gama de trabalho considerada para cada um dos três elementos incluídos no âmbito da validação do método de ensaio. De destacar que a já referida contradição nas conclusões obtidas na aplicação da “ANOVA pesada” (falta de ajuste ao modelo linear) e do teste de Mandel (ajustado ao modelo linear) verificou-se para quase todas as funções de calibração obtidas para os três elementos e poderá ser justificada, como também já foi referido, pela distribuição das concentrações dos padrões de calibração ao longo da gama de trabalho.

Tendo em conta a análise dos brancos, o Pb é, de entre os três elementos, aquele que é menos suscetível a contaminações, o que contribui também para uma menor incerteza. Este fator, em conjunto com a maior sensibilidade, justificam a obtenção de um menor valor de LQ na quantificação de Pb em cabelo.

Comparando os valores máximos obtidos nas estimativas de incerteza associadas à quantificação de Cu e Zn em cabelo, verifica-se que existe uma pequena diferença ( $\approx 0,9\%$ ) entre esses dois valores. Esta pequena diferença pode ser explicada pelo facto desses elementos terem um comportamento químico semelhante, pois estão localizados no mesmo período e em grupos “vizinhos” da tabela periódica. Com base nos valores apresentados na **Tabela 36**, a obtenção de uma maior incerteza global para o Cu, comparativamente ao que se verifica para o Zn, pode ser justificada pela maior incerteza do valor certificado para a concentração de Cu no MRC ERM DB001.

**Tabela 36** – Valores de incerteza-padrão referentes à quantificação de cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb) em cabelo, estimados com base na análise ao MRC RMDB001

Componente de incerteza	Estimativas da incerteza-padrão (%)		
	Cu	Zn	Pb
<b>Valor certificado (MRC)</b>	6,0	2,9	4,5
<b>Precisão (experimental)</b>	6,6	8,4	5,1
<b>Justeza (experimental)</b>	6,8	3,2	5,5
<b>Global (experimental)</b>	<b>9,5</b>	<b>9,0</b>	<b>7,5</b>

As semelhanças no comportamento químico do Cu e Zn refletem-se também nos valores mínimo e máximo obtidos para as recuperações na análise de soluções reforçadas e na proximidade dos valores obtidos para a sensibilidade instrumental. Estas semelhanças justificam a definição dos mesmos requisitos na validação da quantificação desses dois analitos. A principal diferença entre os dois analitos nos vários parâmetros estudados para a validação é a gama de trabalho. Essa diferença é justificada pela maior concentração de Zn no cabelo. O valor superior de LQ referente ao Zn pode ser justificado pela maior suscetibilidade à ocorrência de contaminações com esse elemento, tendo em conta a análise de brancos realizada, o que está de acordo com a experiência do LCA na operação do equipamento de ICP-MS.

É importante realçar que a avaliação das várias características de desempenho do sistema analítico realizada no contexto do trabalho de validação desenvolvido baseia-se num histórico reduzido de medições. Por esse motivo, os requisitos que serão adotados para efeitos de controlo da qualidade ao realizar o tipo de análise estudada em rotina, os quais são definidos em função dos resultados da validação, poderão ser reajustados à medida que sejam obtidos mais resultados, o que permitirá uma avaliação mais robusta das várias características de desempenho. Apesar disso, pode-se concluir, considerando os resultados obtidos, que o sistema analítico estudado permite a quantificação de Cu, Zn e Pb no cabelo por ICP-MS, com uma exatidão de acordo com os critérios estabelecidos neste trabalho.

Tabela 37 – Tabela resumo da validação da análise de chumbo ( $^{206}\text{Pb} + ^{207}\text{Pb} + ^{208}\text{Pb}$ ) em cabelos por ICP-MS

Parâmetros de validação		Avaliação		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	88-112%	89-107%	Valores mínimo e máximo obtidos
	Interferências espectrais	< LD	n.a.	Não foram identificadas possíveis interferências significativas para os isótopos quantificados ( $^{206}\text{Pb}$ , $^{207}\text{Pb}$ e $^{208}\text{Pb}$ ) em cabelo
Quantificação	Coeficiente de correlação ( $r$ )	>0,9990	0,9997	Valor mínimo obtido.
	Sensibilidade/Declive	n.a.	5115 23015	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	1-100 µg/g	Intervalo definido com base nos valores de referência para a concentração de Pb em cabelo
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	1 µg/g	Definido com base nos ensaios preliminares e validado com a análise de brancos e do PVLQ
Precisão	Coef. de variação das leituras instrumentais (mesma leitura)	≤6%	≤5,5%	Valor máximo obtido considerando todas as soluções com concentração de chumbo na gama de trabalho definida
	Coef. de variação das leituras instrumentais (leituras consecutivas)	≤5%	≤2,2%	Valor máximo, obtido em 10 leituras consecutivas do PVLQ
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	≤5%	≤3,8%	Valor máximo obtido na leitura da concentração de 10 réplicas de digestão de uma mesma amostra de cabelo
	Avaliação de duplicados (leitura)	≤5%	≤4,2%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura em condições de repetibilidade (leituras consecutivas)
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	≤10%	≤9,7%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia (teste ANOVA)	≤10 %	≤6,9%	Valor máximo obtido (teste ANOVA a amostra real lida em condições de repetibilidade em 3 dias)
Justeza	Materiais de referência certificado	90-110%	92-110 %	Valores mínimo e máximo de recuperação, obtidos na análise do MRC ERM DB001)
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	n.a.	15,0% (ERM DB001)	Valor de incerteza expandida ( $U$ ), calculado com base nos ensaios aos MRC de cabelo e com fator de expansão $k = 2$ . A incerteza considerada na definição dos requisitos de validação foi a obtida na análise do MRC ERM DB001
			28,6% (GBW 09101b)	

Tabela 38 – Tabela resumo da validação da análise de cobre (<sup>65</sup>Cu) em cabelos por ICP-MS

Parâmetros de validação		Avaliação		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	85-115%	86-112%	Valores mínimo e máximo obtidos
	Interferências espectrais	< LD	n.a.	Não foram identificadas possíveis interferências significativas para o isótopo quantificado ( <sup>65</sup> Cu) em cabelo
Quantificação	Coeficiente de correlação (r)	>0,9990	0,9998	Valor mínimo obtido.
	Sensibilidade/Declive	n.a.	296 1404	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	2-100 µg/g	Intervalo definido com base nos valores de referência para a concentração de Pb em cabelo
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	2 µg/g	Definido com base nos ensaios preliminares e validado com a análise de brancos e do PVLQ
Precisão	Coef. de variação das leituras instrumentais (mesma leitura)	≤10%	≤9,5%	Valor máximo obtido considerando todas as soluções com concentração de chumbo na gama de trabalho definida
	Coef. de variação das leituras instrumentais (leituras consecutivas)	≤8%	≤6,4%	Valor máximo, obtido em 10 leituras consecutivas do PVLQ
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	≤8%	≤6,8%	Valor máximo obtido na leitura da concentração de 10 réplicas de digestão de uma mesma amostra de cabelo
	Avaliação de duplicados (leitura)	≤8%	≤7,4%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura em condições de repetibilidade (leituras consecutivas)
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	≤12%	≤9,4%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia (teste ANOVA)	≤10%	≤6,2%	Valor máximo obtido
Justeza	Materiais de referência certificado	85-115%	89-106%	Recuperação relativamente ao valor de concentração certificada (Os valores mínimo e máximo correspondem ao MRC GBW 09101b)
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	n.a.	18,9% (ERM DB001)	Valor de incerteza expandida (U), calculado com base nos ensaios aos MRC de cabelo e com fator de expansão $k = 2$ . A incerteza considerada na definição dos requisitos de validação foi a obtida na análise do MRC ERM DB001
			13,9% (GBW 09101b)	

Tabela 39 – Tabela resumo da validação da análise de zinco ( $^{66}\text{Zn}$ ) em cabelos por ICP-MS

Parâmetros de validação		Avaliação		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	85-115%	85-111%	Valores mínimo e máximo obtidos
	Interferências espectrais	<LD	n.a.	Não foram identificadas possíveis interferências significativas para o isótopo quantificado ( $^{66}\text{Zn}$ ) em cabelo
Quantificação	Coeficiente de correlação ( $r$ )	>0,9990	0,9994	Valor mínimo obtido.
	Sensibilidade/Declive	n.a.	244 980	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	10-1000 $\mu\text{g/g}$	Intervalo definido com base nos valores de referência para a concentração de Pb em cabelo
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	10 $\mu\text{g/g}$	Definido com base nos ensaios preliminares e validado com a análise de brancos e do PVLQ
Precisão	Coef. de variação das leituras instrumentais (mesma leitura)	$\leq 10\%$	$\leq 9,7\%$	Valor máximo obtido considerando todas as soluções com concentração de chumbo na gama de trabalho definida
	Coef. de variação das leituras instrumentais (leituras consecutivas)	$\leq 8\%$	$\leq 1,9\%$	Valor máximo, obtido em 10 leituras consecutivas do PVLQ
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	$\leq 8\%$	$\leq 4,3\%$	Valor máximo obtido na leitura da concentração de 10 réplicas de digestão de uma mesma amostra de cabelo
	Avaliação de duplicados (leitura)	$\leq 8\%$	$\leq 5,4\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura em condições de repetibilidade (leituras consecutivas)
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	$\leq 12\%$	$\leq 10,9\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia (teste ANOVA)	$\leq 10\%$	$\leq 8,6\%$	Valor máximo obtido (teste ANOVA aplicado ao PVLQ)
Justeza	Materiais de referência certificado	85-115%	85-111%	Recuperação relativamente ao valor de concentração certificada (Os valores mínimo e máximo correspondem, respetivamente, ao MRC ERM DB001 e ao MRC GBW 09101b)
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	n.a.	18,0% (ERM DB001)	Valor de incerteza expandida ( $U$ ), calculado com base nos ensaios aos MRC de cabelo e com fator de expansão $k = 2$ . A incerteza considerada na definição dos requisitos de validação foi a obtida na análise do MRC ERM DB001
			16,2% (GBW 09101b)	



## **5. Conclusões e perspectivas para trabalhos futuros**



Este trabalho de Estágio foi realizado no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro (UA), tendo os seus objetivos sido estabelecidos com base na vontade do LCA em aumentar o número de matrizes acreditadas, para além das que neste momento fazem parte do seu âmbito da acreditação (água e solo). Após avaliação dos interesses do LCA, estabeleceu-se, como objetivo deste Estágio, o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a quantificação de metais em amostras de cabelo humano.

A informação obtida na pesquisa bibliográfica realizada permitiu constatar que as técnicas analíticas mais usadas na análise de elementos químicos em cabelo são as técnicas de ICP-MS e ICP-OES, associadas a digestão assistida por micro-ondas. Assim, o LCA possui todos os recursos necessários para poder vir a tornar-se um laboratório de referência nacional para este tipo de análises, que não é ainda muito explorado em Portugal (ao contrário do que acontece noutros países), podendo alargar as suas competências e carteira de clientes.

A pesquisa bibliográfica realizada sobre a análise de metais em cabelo permite afirmar que existem muitas publicações referentes à análise química desta matriz, mas há ainda pouco consenso quanto à validade dos procedimentos analíticos adotados e à respetiva interpretação toxicológica dos resultados obtidos, principalmente devido à variabilidade natural das características do cabelo e às lacunas nas práticas de controlo/garantia de qualidade dos resultados, verificadas em alguns trabalhos publicados. Esses fatores resultam na dificuldade em definir valores de referência para a concentração de elementos químicos no cabelo e em avaliar a proveniência endógena ou exógena desses elementos.

Relativamente às questões da qualidade dos resultados, a qual depende dos sistemas analíticos usados, as entidades que realizam análises químicas têm vindo a demonstrar maior sensibilidade para a importância desse assunto. A maior preocupação com as questões da qualidade dos resultados é também justificada pela maior exigência atual relativamente ao reconhecimento da competência dos laboratórios, a qual adquiriu maior relevância desde a publicação da norma ISO/IEC 17025 em 1999, o documento que define os requisitos técnicos e de gestão necessários para a acreditação de laboratórios de ensaio. No contexto específico da análise química de cabelo, a maior atenção às questões de controlo/garantia da qualidade revelada nos últimos anos deve-se à controvérsia que surgiu de forma mais

expressiva na década de 1980, envolvendo os laboratórios que comercializavam serviços de quantificação de vários elementos químicos em cabelo humano.

Os resultados obtidos na análise aos MRC de cabelo para os elementos em estudo, permitem concluir que, globalmente, foram obtidos valores de *z-score* e percentagens de recuperação que correspondem a uma exatidão satisfatória.

A avaliação das várias características de desempenho do sistema analítico abrangidas pela validação realizada resulta na conclusão de que o sistema analítico considerado permite uma quantificação adequada de cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb) em cabelo. De notar que a validação realizada centrou-se nas etapas de digestão de cabelo e de quantificação por ICP-MS e, portanto, as etapas que antecedem essa fase final do sistema analítico não foram avaliadas de forma tão exaustiva, embora constituam normalmente a maior fonte de incerteza. Apesar disso, uma correta avaliação dessas etapas, nomeadamente as de secagem e lavagem, exige que as etapas que as sucedem estejam devidamente controladas, para que efetivamente se possa avaliar o efeito dessas etapas de tratamento da amostra.

O trabalho apresentado neste relatório de Estágio permitiu a aquisição de experiência que poderá ser útil no futuro desenvolvimento e validação de métodos de análise de novas matrizes no LCA. Contudo, será necessário desenvolver mais trabalho, nomeadamente a futura participação num ensaio de comparação interlaboratorial para a análise de elementos químicos em cabelo (QMEQAS), requisito obrigatório para a acreditação deste tipo de ensaio tendo em conta o procedimento para a acreditação de laboratórios definido pelo IPAC (DRC005).

A experiência acumulada no LCA no contexto da acreditação de alguns dos ensaios realizados no serviço de ICP permitiu ao autor deste trabalho, o estagiário, o contacto com técnicas instrumentais de análise e práticas de controlo e garantia da qualidade, o que proporcionou o desenvolvimento de competências relacionadas com a validação de sistemas analíticos, área da química analítica que ganha cada vez mais relevância no atual contexto da investigação, mas também do mercado de trabalho. A aquisição desse tipo de experiência foi também um dos objetivos do desenvolvimento deste estágio que pode considerar-se como tendo sido cumprido.

Como perspectiva de trabalho futuro, poderá proceder-se à validação do sistema analítico desenvolvido na quantificação de mais elementos, para além do cobre, zinco e chumbo, os três elementos abrangidos pelo âmbito da validação realizada neste trabalho.

Também na perspectiva de trabalho futuro, poderão ser desenvolvidos procedimentos para avaliar o efeito da lavagem e da secagem na quantificação de metais em cabelo, de forma a validar todo o sistema analítico, desde a receção das amostras no LCA à sua quantificação por ICP-MS.



## **6. Referências**





## 6.1. Bibliografia

- Agius, R. (2014). "The 18th congress of the Society of Hair Testing (SoHT) in Geneva." Drug Testing and Analysis **6**(1): 1-1.
- Analytical Methods Committee, A. N. (2012). "Dark uncertainty." Analytical Methods **4**(9): 2609-2612.
- Antunes, S. C., A. C. Duarte, F. Gonçalves and R. Pereira (2009). "Análise de cabelos: a impressão digital ambiental." Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos **1**(2): 136-146.
- Arnold, W. and K. Puschel (1981). "Experimental studies on hair as a indicator of past or present drug use." Journal of the Forensic Science Society **21**(2): 83.
- Assarian, G. and D. Oberleas (1977). "Effect of washing procedures on trace-element content of hair." Clinical Chemistry **23**(9): 1771-1772.
- Asuero, A., A. Sayago and A. Gonzalez (2006). "The correlation coefficient: An overview." Critical Reviews in Analytical Chemistry **36**(1): 41-59.
- Baar, M. R. (2011). Greener organic reactions under microwave heating. Green Organic Chemistry in Lecture and Laboratory. A. P. Dicks, CRC Press: 225-256.
- Barbosa, J., J. Faria, F. Carvalho, M. Pedro, O. Queiros, R. Moreira and R. J. Dinis-Oliveira (2013). "Hair as an alternative matrix in bioanalysis." Bioanalysis **5**(8): 895-914.
- Barlow, P. J. and M. Kepel (1980). Metal and sulfur content of hair in relation to certain mental status. Hair, Trace Elements & Human Illness. A. C. Brown and R. G. Crounse, Praeger Publishers: 105-127.
- Barrett, S. (1985). "Commercial hair analysis: Science or scam?" JAMA: The Journal of the American Medical Association **254**(8): 1041-1045.
- Barwick, V. and S. Wood (2010). "Achieving metrological traceability in chemical and bioanalytical measurement." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **25**(6): 785-799.
- Baumgartner, A. M., P. F. Jones, W. A. Baumgartner and C. T. Black (1979). "Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories." Journal of Nuclear Medicine **20**(7): 748-752.
- Bencko, V. (2005). Hair and exposure to environmental pollutants. Hair in Toxicology: An Important Bio-monitor. D. J. Tobin. Cambridge, RSC Publishing: 159-174.
- Bencze, K. (1994). Determination of metals in human hair. Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry. H. G. Seiler, A. Sigel and S. H. New York, Marcel Dekker, Inc.: 201-216.
- Berglund, M. and M. E. Wieser (2011). "Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report)." Pure and Applied Chemistry **83**(2): 397-410.
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP, ISO and OIML (2008a). Evaluation of measurement data – guide for the expression of uncertainty in measurement (JCGM 100:2008).
- BIPM, I., I. IFCC, I. IUPAC and O. ISO (2008b). The international vocabulary of metrology – basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edn. JCGM 200:2012.
- Blume-Peytavi, U., K. Hillmann and M. Guarrera (2008). Hair growth assessment techniques. Hair Growth and Disorders. Springer: 125-157.
- Borella, P., S. Rovesti, E. Caselgrandi and A. Bargellini (1996). "Quality control in hair analysis: A systematic study on washing procedures for trace element determinations." Microchimica Acta **123**(1-4): 271-280.
- Brüggemann, L., W. Quapp and R. Wennrich (2006). "Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements." Accreditation and Quality Assurance **11**(12): 625-631.

Burns, D. T., K. Danzer and A. Townshend (2009). "A Tutorial discussion of the use of the terms "robust" and "rugged" and the associated characteristics of "robustness" and "ruggedness" as used in descriptions of analytical procedures." Journal of the Association of Public Analysts (Online) **37**: 40-60.

Bush, V. J., T. P. Moyer, K. P. Batts and J. E. Parisi (1995). "Essential and toxic element concentrations in fresh and formalin-fixed human autopsy tissues." Clinical Chemistry **41**(2): 284-294.

Byrn, S. R. (2015). Predictive approaches to establishing, understanding, and communicating risk with emphasis on early development. Discovering and Developing Molecules with Optimal Drug-Like Properties. A. C. Templeton, S. R. Byrn, R. J. Haskell and T. E. Prisinzano, Springer New York. **15**: 195-208.

Cargnello, J. A., J. J. Powell, R. P. H. Thompson, P. R. Crocker and F. Watt (1995). "Elemental hair analysis using nuclear microscopy and X-ray energy dispersive spectroscopy." Analyst **120**(3): 783-787.

Caroli, S., A. Alimonti, E. Coni, F. Petrucci, O. Senofonte and N. Violante (1994). "The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: A systematic review." Critical Reviews in Analytical Chemistry **24**(5-6): 363-398.

Caroli, S., O. Senofonte, N. Violante, L. Fornarelli and A. Powar (1992). "Assessment of reference values for elements in hair of urban normal subjects." Microchemical Journal **46**(2): 174-183.

Casper, J. L. (1857-1858). Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizin. August Hirschwald, Berlin. (2 volumes)

Chatt, A., C. Secord, B. Tiefenbach and R. Jervis (1980). Scalp hair as a monitor of community exposure to environmental pollutants. Hair, Trace Elements & Human Illness. New York, Praeger Publishers: 46-73.

Chittleborough, G. (1980). "A chemist's view of the analysis of human hair for trace elements." Science of The Total Environment **14**(1): 53-75.

Chittleborough, G. and B. J. Steel (1980). "Is human hair a dosimeter for endogenous zinc and other trace elements?" Science of The Total Environment **15**(1): 25-35.

Chojnacka, K. and M. Mikulewicz (2012). Hair mineral analysis in the assessment of human exposure to metals. Handbook of Hair in Health and Disease. V. R. Preedy, Wageningen Academic Publishers. **1**: 278-292.

Coimbra, J. M. S. C. D. (2007). Controlo de qualidade aplicado à análise de água de consumo por ICP-MS, Universidade de Aveiro.

Committee, A. M. (1994). "Is my calibration linear?" Analyst **119**(11): 2363-2366.

Cordeiro, N. and A. Magalhães (2004). Introdução à Estatística – Uma perspectiva química. Lidel – Edições Técnicas, Lda.

Cornelis, R. (1973). "Neutron activation analysis of hair failure of a mission." Journal of Radioanalytical Chemistry **15**(1): 305-316.

Cortes Toro, E., J. J. M. De Goeij, J. Bacso, Y.-D. Cheng, L. Kinova, J. Matsubara, S. Niese, T. Sato, G. R. Wesenberg, Y. Muramatsu and R. M. Parr (1993). "The significance of hair mineral analysis as a means for assessing internal body burdens of environmental pollutants: Results from an IAEA co-ordinated research programme." Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry **167**(2): 413-421.

Cruz, A., E. Filipe, O. Pellegrino, J. C. V. Oliveira, A. C. Baratto, S. P. de Oliveira and V. M. L. Mendoza (2012). Vocabulário Internacional de Metrologia – Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM), IPQ, INMETRO.

Curie, L. A. (1995). "Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities." Pure and Applied Chemistry **67**(10): 1699-1723.

De Bièvre, P. (2012). "The 2012 International Vocabulary of Metrology: "VIM". " Accreditation and Quality Assurance **17**(2): 231-232.

Deppisch, L. M., J. A. Centeno, D. J. Gemmel and N. L. Torres (1999). "Andrew Jackson's exposure to mercury and lead: poisoned president?" JAMA: The Journal of the American Medical Association **282**(6): 569-571.

Druyan, M. E., D. Bass, R. Puchyr, K. Urek, D. Quig, E. Harmon and W. Marquardt (1998). "Determination of reference ranges for elements in human scalp hair." Biological Trace Element Research **62**(3): 183-197.

Dutcher, T. F. and S. Rothman (1951). "Iron, copper and ash content of human hair of different colors." The Journal of Investigative Dermatology **17**(2): 65-68.

Eisinger, J. (2007). "The lead in Beethoven's hair." Toxicological and Environmental Chemistry **90**(1): 1-5.

Eurachem (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd. B. Magnusson and Ö. U., Eurachem.

Finley-Jones, H. J., J. L. Molloy and J. A. Holcombe (2008). "Choosing internal standards based on a multivariate analysis approach with ICP (TOF) MS." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **23**(9): 1214-1222.

Forshufvud, S., H. Smith and A. Wassen (1961). "Arsenic content of Napoleon I's hair probably taken immediately after his death." Nature **192**: 103-105.

Forshufvud, S., H. Smith and A. Wassén (1964). "Napoleon's illness 1816–1821 in the light of activation analyses of hairs from various dates." Archiv für Toxikologie **20**(4): 210-219.

Frazão, S. V. (2008). Estudo da determinação de elementos traço em cabelos humanos pelo método de análise por ativação com nêutrons, Universidade de São Paulo.

Fridman, A. (2008). Plasma Chemistry. Cambridge University Press.

Gašljević, V. (2010). "Method validation and measurement uncertainty." Biochemia Medica **20**(1): 57-63.

Gillespie, A. and S. Upton (1999). "Marketing Valid Analytical Measurement." Accreditation and Quality Assurance **4**(1-2): 45-49.

Goldblum, R. W., L. R. Goldbaum and W. N. Piper (1954). "Barbiturate Concentrations in the Skin and Hair of Guinea Pigs." The Journal of Investigative Dermatology **22**(2): 121-128.

Goullé, J.-P. (2006). Metals. Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair. P. Kintz, CRC Press: 343-369.

Goullé, J.-P., L. Mahieu, J. Castermant, N. Neveu, L. Bonneau, G. Lainé, D. Bouige and C. Lacroix (2005). "Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values." Forensic Science International **153**(1): 39-44.

Grupe, G. and K. Dörner (1989). "Trace elements in excavated human hair." Zeitschrift für Morphologie und Anthropologie **77**(3): 297-308.

Gunasegaran, J. P. (2014). Integumentary system. Textbook of Histology and a Practical guide. Elsevier Health Sciences.

Hambidge, K. M. (1982). "Hair analyses: worthless for vitamins, limited for minerals." The American Journal of Clinical Nutrition **36**(5): 943-949.

Harkey, M. R. (1993). "Anatomy and physiology of hair." Forensic Science International **63**(1-3): 9-18.

Harkins, D. K. and A. S. Susten (2003). "Hair analysis: exploring the state of the science." Environmental Health Perspectives **111**(4): 576-578.

Harris, D. C. (2010). Quantitative Chemical Analysis. W. H. Freeman.

Henderson, G. L. (1993). "Mechanisms of drug incorporation into hair." Forensic Science International **63**(1–3): 19-29.

Hilderbrand, D. C. and D. H. White (1974). "Trace-element analysis in hair: an evaluation." Clinical Chemistry **20**(2): 148-151.

Hindmarsh, J. T. and J. Savory (2008). "The death of Napoleon, cancer or arsenic?" Clinical Chemistry **54**(12): 2092-2093.

Hindmarsh, T. and P. F. Corso (2002). Napoleon's hair, external arsenic or arsenic ingestion? Annales de Toxicologie Analytique.

Hinners, T. A., W. J. Terrill, J. L. Kent and A. V. Colucci (1974). "Hair-metal binding." Environmental Health Perspectives **8**: 191-199.

Hoening, M. (2001). "Preparation steps in environmental trace element analysis—facts and traps." Talanta **54**(6): 1021-1038.

Hong, L. and J. D. Simon (2007). "Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin." The Journal of Physical Chemistry B **111**(28): 7938-7947.

Hovind, H., B. Magnusson, M. Krysell, U. Lund and I. Mäkinen (2011). Nordtest Technical Report 569 – Internal Quality Control: Handbook for Chemical laboratories. Nordic Innovation, Oslo, Norway.

Hung, M. H., P. R. Resnick, B. E. Smart and W. H. Buck (1996). Fluorinated Plastics, Amorphous. Polymeric Materials Encyclopedia. J. C. Salamone. Boca Raton (Florida), CRC Press: 2466-2476.

ICH, E. W. G. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1). Geneva (Switzerland).

ISO (2003). ISO 17294-2:2003 — Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 2: Determination of 62 elements Geneva (Switzerland).

ISO (2004). ISO 17294-1:2004 — Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 1: General guidelines. Geneva (Switzerland).

ISO (2012). ISO 11352:2012 — Water quality — Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data. Geneva (Switzerland).

ISO/IEC (2005). ISO/IEC 17025:2005 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva (Switzerland).

Jablonski, N. G. (2013). The naked truth. Becoming Human: Our Past, Present and Future. S. American, Scientific American: 42-49.

Jenkins, D. W. (1979). Toxic trace metals in mammalian hair and nails. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.

Jiménez, M. R. and G. R. Kuhn (2009). Toxicología fundamental. Ediciones Díaz de Santos, S.A.

Jones, L. N. and D. E. Rivett (1997). "The role of 18-methyleicosanoic acid in the structure and formation of mammalian hair fibres." Micron **28**(6): 469-485.

Kaminski, M. V. Jr and M. J. Glade (2001). "Accuracy of hair mineral analysis." JAMA: The Journal of the American Medical Association **285**(12): 1577.

Karen, S. and K. Robert (2006). Drug incorporation into hair. Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair. CRC Press: 1-23.

Katz, S. A. and A. Chatt (1988). Hair analysis: applications in the biomedical and environmental sciences. Wiley-VCH.

Kempson, I. and W. Skinner (2012). "A comparison of washing methods for hair mineral analysis: internal versus external effects." Biological Trace Element Research **150**(1-3): 10-14.

Kintz, P. (1996). Drug Testing in Hair. Taylor & Francis.

Kintz, P. (2004). "Value of hair analysis in postmortem toxicology." Forensic Science International **142**(2-3): 127-134.

Kintz, P., M. Ginot and V. Cirimele (2006). "Multi-element screening by ICP-MS of two Specimens of Napoleon's hair." Journal of Analytical Toxicology **30**(8): 621-623.

Klevay, L. M., B. R. Bistrian, C. R. Fleming and C. G. Neumann (1987). "Hair analysis in clinical and experimental medicine." The American Journal of Clinical Nutrition **46**(2): 233-236.

Lavagnini, I. and F. Magno (2007). "A statistical overview on univariate calibration, inverse regression, and detection limits: application to gas chromatography/mass spectrometry technique." Mass Spectrometry Reviews **26**(1): 1-18.

Lazar, P. (1974). "Hair analysis: What does it tell us?" JAMA: The Journal of the American Medical Association **229**(14): 1908-1909.

Lin, X., D. Alber and R. Henkelmann (2004). "Elemental contents in Napoleon's hair cut before and after his death: did Napoleon die of arsenic poisoning?" Analytical and Bioanalytical Chemistry **379**(2): 218-220.

Lin, X. and R. Henkelmann (2003). "Contents of arsenic, mercury and other trace elements in Napoleon's hair determined by INAA using the k0-method." Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry **257**(3): 615-620.

Lippens, S., G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele and W. Declercq (2005). "Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification." Cell Death & Differentiation **12** **Supplement 2**: 1497-1508.

Lugli, A., A. K. Lugli and M. Horcic (2005). "Napoleon's autopsy: new perspectives." Human Pathology **36**(4): 320-324.

M'Baku, S. B. and R. M. Parr (1982). "Interlaboratory study of trace and other elements in the IAEA powdered human hair reference material, HH-1." Journal of Radioanalytical Chemistry **69**(1-2): 171-180.

Magnusson, B., T. Näykki, H. Hovind and M. Krysell (2004). Nordtest Technical Report 537 – Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories.

Mahmood, Q., A. Rashid, S. Ahmad, M. Azim and M. Bilal (2012). Current Status of Toxic Metals Addition to Environment and Its Consequences. The Plant Family Brassicaceae. N. A. Anjum, I. Ahmad, M. E. Pereira et al., Springer Netherlands. **21**: 35-69.

Marieb, E. N. and K. Hoehn (2009). Anatomia e Fisiologia. 3ª edição. Artmed Editora.

May, T. W. and R. H. Wiedmeyer (1998). "A table of polyatomic interferences in ICP-MS." Atomic Spectroscopy **19**(5): 150-155.

Menditto, A., M. Patriarca and B. Magnusson (2007). "Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision." Accreditation and Quality Assurance **12**(1): 45-47.

Mermet, J.-M. (2007). Fundamental Principles of Inductively Coupled Plasmas. Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications. S. J. Hill, Blackwell Publishing: 27-60.

Mescher, A. (2009). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 12th. McGraw-hill.

Mescher, A. (2013). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13th. McGraw-Hill Education.

Miekeley, N., M. T. Dias Carneiro and C. L. da Silveira (1998). "How reliable are human hair reference intervals for trace elements?" Science of The Total Environment **218**(1): 9-17.

Mikasa, H., Y. Suzuki, N. Fujii and K. Nishiyama (1988). "Adsorption and elution of metals on hair." Biological Trace Element Research **16**(1): 59-66.

Miller, J. N. and J. C. Miller (2010). Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry 6th edition. Prentice Hall/Pearson Education.

Moeller, M. R. and H. P. Eser (1996). The Analytical Tools for Hair Testing. Drug Testing in Hair. P. Kintz, CRC Press (Taylor & Francis Group): 95-120.

Morton, J., V. A. Carolan and P. H. E. Gardiner (2002). "Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **455**(1): 23-34.

Namkoong, S., S. P. Hong, M. H. Kim and B. C. Park (2013). "Reliability on Intra-Laboratory and Inter-Laboratory Data of Hair Mineral Analysis Comparing with Blood Analysis." Annals of Dermatology **25**(1): 67-72.

Nelson, D. L. and M. M. Cox (2013). Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman.

Obrusnik, I., J. Gislason, D. Maes, D. K. McMillan, J. D'Auria and B. D. Pate (1973). "The variation of trace element concentrations in single human head hairs." Journal of Radioanalytical Chemistry **15**(1): 115-134.

Odland, G. F. (1953). "Some microscopic studies of the keratinization of human hair." The Journal of Investigative Dermatology **21**(5): 305-312.

Paddock, F. K., C. C. Loomis, Jr. and A. K. Perkons (1970). "An inquest on the death of Charles Francis Hall." The New England Journal of Medicine **282**(14): 784-786.

Park, H.-S., K.-O. Shin and J.-S. Kim (2007). "Assessment of reference values for hair minerals of Korean preschool children." Biological Trace Element Research **116**(2): 119-130.

Pautard, F. G. E. (1963). "Mineralization of Keratin and its Comparison with the Enamel Matrix." Nature **199**(4893): 531-535.

Peet, D. J. (1994). Protein-bound fatty acids in mammalian hair fibres.

Pereira, S. P., J. Oliveira and R. Rajendram (2012). Arsenic in the hair. Handbook of Hair in Health and Disease. V. R. Preedy, Wageningen Academic Publishers. **1**: 238-254.

PerkinElmer (2011) "The 30 minute guide of ICP-MS."

Phil, R., H. Drake, F. Vrana, A. Brown and R. Crounse (1980). Hair analysis in learning and behaviour problems. Hair, Trace Elements & Human Illness. A. C. Brown and R. G. Crounse, Praeger Publishers: 128-143.

Popescu, C. and H. Hocker (2007). "Hair – the most sophisticated biological composite material." Chemical Society Reviews **36**(8): 1282-1291.

Pozebon, D., V. L. Dressler and A. J. Curtius (1999). "Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações." Química Nova **22**: 838-846.

Pragst, F. and M. A. Balikova (2006). "State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse." Clinical Chimica Acta **370**(1-2): 17-49.

Prota, G. (2000). "Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint." Pigment Cell Research **13**(4): 283-293.

Rabinovich, S. (2013). The international vocabulary of metrology and the guide to the expression of uncertainty in measurement: analysis, criticism, and recommendations. Evaluating Measurement Accuracy. Springer New York: 269-285.

Rabinowitz, M., G. Wetherill and J. Kopple (1976). "Delayed appearance of tracer lead in facial hair." Archives of Environmental & Occupational Health **31**(4): 220-223.

Raposo, J. C., P. Navarro, A. Sarmiento, E. Arribas, M. Irazola and R. M. Alonso (2014). "Analytical proposal for trace element determination in human hair. Application to the Biscay province population, northern Spain." Microchemical Journal **116**(0): 125-134.

Reiter, C. (2007). "The causes of Beethoven's death and his locks of hair: a forensic-toxicological investigation." The Beethoven Journal **22**(1): 2-5.

RELACRE (1996). Guia RELACRE 3 – Validação de resultados em laboratórios químicos. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE).

RELACRE (1998). Guia RELACRE 9 – Alguns exemplos de cartas de controlo em laboratórios de análises químicas.

RELACRE (2000). Guia RELACRE 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE).

Rivlin, R. S. (1983). "Misuse of hair analysis for nutritional assessment." The American Journal of Medicine **75**(3): 489-493.

Robbins, C. (2012a). Bleaching and oxidation of human hair. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. Springer Berlin Heidelberg: 263-328.

Robbins, C. (2012b). Chemical composition of different hair types. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. Springer Berlin Heidelberg: 105-176.

Robbins, C. (2012c). Morphological, macromolecular structure and hair growth. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. Springer Berlin Heidelberg: 1-104.

Rodushkin, I. and M. D. Axelsson (2000). "Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden." Science of The Total Environment **262**(1-2): 21-36.

Ryabukhin, Y. S. (1976). Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants, International Atomic Energy Agency, Agency's Laboratories, Analytical Quality Control Services, Seibersdorf (Austria).

Ryan, D. E., J. Holzbecher and D. C. Stuart (1978). "Trace elements in scalp-hair of persons with multiple sclerosis and of normal individuals." Clinical Chemistry **24**(11): 1996-2000.

Sachs, H. (1997). "History of hair analysis." Forensic Science International **84**(1-3): 7-16.

Salmela, S., E. Vuori and J. O. Kilpiö (1981). "The effect of washing procedures on trace element content of human hair." Analytica Chimica Acta **125**(0): 131-137.

Sargent, M. (2003). "UK delivery of traceable chemical measurements in the 21st century: building on the foundation of the VAM programme." Accreditation and Quality Assurance **8**(10): 480-482.

Scientific, T. F. (2008). Application Note: 40770 – Reduction of Refractory Oxide Polyatomic Interference Using Kinetic Energy Discrimination (Thermo Scientific XSERIES 2 ICP-MS with 3rd Generation CCTED).

Seidel, S. (2001). "Accuracy of hair mineral analysis – reply." JAMA: The Journal of the American Medical Association **285**(12): 1576-1578.

Seidel, S., R. Kreutzer, D. Smith, S. McNeel and D. Gilliss (2001). "Assessment of commercial laboratories performing hair mineral analysis." JAMA: The Journal of the American Medical Association **285**(1): 67-72.

Senofonte, O., N. Violante and S. Caroli (2000). "Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **14**(1): 6-13.

Senofonte, O., N. Violante, L. Fornarelli, E. Beccaloni, A. Powar and S. Caroli (1989). "Reference values for elements of toxicological, clinical and environmental interest in hair of urban subjects." Annali dell'Istituto Superiore di Sanità **25**(3): 385-392.

Shamberger, R. J. (2002). "Validity of hair mineral testing." Biological Trace Element Research **87**(1-3): 1-28.

Skoog, D., D. West, F. Holler and S. Crouch (2013). Fundamentals of Analytical Chemistry. Cengage Learning.

Smith, F. P. and D. A. Pomposini (1981). "Detection of phenobarbital in bloodstains, semen, seminal stains, saliva, saliva stains, perspiration stains, and hair." Journal of Forensic Sciences **26**(3): 582-586.

Smith, H., S. Forshufvud and A. Wassen (1962). "Distribution of Arsenic in Napoleon's Hair." Nature **194**(4830): 725-726.

Sperling, L. C., S. E. Cowper and E. A. Knopp (2012). Glossary. An Atlas of Hair Pathology with Clinical Correlations. CRC Press: 209-212.

Sunshine, I. (1996). Introduction. Drug Testing in Hair. P. Kintz, CRC Press (Taylor & Francis Group): 1-4.

Suzuki, O., H. Hattori and M. Asano (1984). "Detection of methamphetamine and amphetamine in a single human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry." Journal of Forensic Sciences **29**(2): 611-617.

Suzuki, T., H. Akagi, K. Arimura, T. Ando, M. Sakamoto, H. Satoh, A. Naganuma, M. Futatsuka and A. Matsuyama (2004). "Mercury analysis manual." Ministry of the Environment, Japan.

Taylor, H. E. (2001). Chapter 2 – Atomic Structure. Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. H. E. Taylor. San Diego, Academic Press: 7-13.

ThermoElemental (2001). AAS, GFAAS, ICP or ICP-MS? Which technique should I use? – An elementary overview of elemental analysis.

Thomas, R. (2001a). "A beginner's guide to ICP-MS – Part III: The plasma source." Spectroscopy **16**(6): 26-30.

Thomas, R. (2001b). "A Beginner's Guide to ICP-MS – Part IV: The Interface Region." Spectroscopy **16**(7): 26-28; 34.

Thomas, R. (2001c). "A Beginner's Guide to ICP-MS – Part VI: The Mass Analyzer." Spectroscopy **16**(10): 44-49.

Thomas, R. (2002a). "A Beginner's Guide to ICP-MS – Part X: Detectors." Spectroscopy **17**(4): 34-39.

Thomas, R. (2002b). "A beginner's guide to ICP-MS – Part XI: Peak measurement protocol." Spectroscopy **17**(7): 28-+.

Thomas, R. (2013). Practical Guide to ICP-MS: a tutorial for beginners. 3rd edition. Taylor & Francis.

Thompson, M., S. L. Ellison and R. Wood (2002). "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)." Pure and Applied Chemistry **74**(5): 835-855.

Thompson, M. and S. R. Ellison (2011). "Dark uncertainty." Accreditation and Quality Assurance **16**(10): 483-487.

Tobin, D. J. (2008). Biology of Hair Follicle Pigmentation. Hair Growth and Disorders. U. Blume-Peytavi, A. Tosti and R. M. Trüeb, Springer Berlin Heidelberg: 51-74.

Valente, D., M. Cassini, M. Pigliapochi and G. Vansetti (1981). "Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction." Clinical Chemistry **27**(11): 1952-1953.



- Vandecasteele, C., M. Nagels, H. Vanhoe and R. Dams (1988). "Suppression of analyte signal in inductively-coupled plasma/mass spectrometry and the use of an internal standard." Analytica Chimica Acta **211**: 91-98.
- Vessman, J., R. I. Stefan, J. F. van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D. T. Burns, A. Fajgelj and H. Müller (2001). "Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001)." Pure and Applied Chemistry **73**(8): 1381-1386.
- Voet, D. and J. G. Voet (2010). Three-Dimensional Structures of Proteins. Biochemistry. Wiley: 221-277.
- Vogt, A., K. J. McElwee and U. Blume-Peytavi (2008). Biology of the Hair Follicle. Hair Growth and Disorders. U. Blume-Peytavi, A. Tosti and R. M. Trüeb, Springer Berlin Heidelberg: 1-22.
- Walsh, W. J. (1986). "Commercial hair analysis: Science or scam?" JAMA: The Journal of the American Medical Association **255**(19): 2603-2603.
- Wang, J., E. H. Evans and J. A. Caruso (1991). "Minimization of non-spectroscopic matrix interferences for the determination of trace elements in fusion samples by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **6**(8): 605-608.
- Ward, N. I., N. M. Spyrou and A. A. Damyanova (1987). "Study of hair element content from an urban Bulgarian population using NAA assessment of environmental status." Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry **114**(1): 125-135.
- Watts, D. L. and J. M. Mercola (2001). "Accuracy of hair mineral analysis." JAMA: The Journal of the American Medical Association **285**(12): 1576-1577.
- Weider, B. and J. H. Fournier (1999). "Activation analyses of authenticated hairs of Napoleon Bonaparte confirm arsenic poisoning." The American Journal of Forensic Medicine and Pathology **20**(4): 378-382.
- Yu, J., D.-W. Yu, D. M. Checkla, I. M. Freedberg and A. P. Bertolino (1993). "Human hair keratins." The Journal of Investigative Dermatology **101**(s1): 56S-59S.
- Zaidi, Z. and S. Walton (2013). Skin: structure, function and development. A Manual of Dermatology. 1st edition. Jaypee Brothers Medical Publishers: 10-47.

## 6.2. Referências da Web

- [1] – <http://www.ua.pt/lca/>  
Acesso em setembro/outubro de 2014.
- [2] –  
<https://www.google.pt/maps/place/Laborat%C3%B3rio+Central+de+An%C3%A1lises/data=!4m2!3m1!1s0xd23a2ab8af11a7d:0x4e7682ed6bcbf834?sa=X&ved=0CB0Q8gEwAGoVChMI7Y7P4sKGyAIVQl4UCh3Jrwpu>  
Acesso em dezembro de 2014
- [3] – [http://www.escutar.eu/fotos/UA\\_046.png](http://www.escutar.eu/fotos/UA_046.png)  
Acesso em dezembro de 2014
- [4] – <http://www.ciceco.ua.pt/files/lca.jpg>  
Acesso em dezembro de 2014
- [5] – <http://www.ipac.pt/docsig/?5WH4-9MC8-6O1L-TY76>  
Acesso em agosto de 2015
- [6] – <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/DRC002.pdf>  
Acesso em agosto de 2015
- [7] – <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/drc005.pdf>.

Acesso a 10/11/2014

[8] – [http://www.hair-science.com/\\_int/\\_en/topic/topic\\_sousrub.aspx?tc=ROOT-HAIR-SCIENCE^PORTRAIT-OF-AN-UNKNOWN-ELEMENT^WHAT-WE-DO-SEE&cur=WHAT-WE-DO-SEE](http://www.hair-science.com/_int/_en/topic/topic_sousrub.aspx?tc=ROOT-HAIR-SCIENCE^PORTRAIT-OF-AN-UNKNOWN-ELEMENT^WHAT-WE-DO-SEE&cur=WHAT-WE-DO-SEE).

Acesso a 25/11/2014

[9] – <http://www.inspq.qc.ca/ctqenglish/eqas/qmeqas/description>.

Acesso a 12/12/2014

[10] – <http://www.inorganicventures.com/periodic-table>

Acesso a 12/12/2014

[11] – <http://www.nmschembio.org.uk/GenericArticle.aspx?m=108&amid=1285>.

Acesso a 05/10/2014.

[12] – <https://www.nde-ed.org/GeneralResources/ErrorAnalysis/UncertaintyTerms.htm>

Acesso a 30/10/2014

[13] – [http://www.erm-crm.org/ERM\\_products/search/certificates/DB001.pdf](http://www.erm-crm.org/ERM_products/search/certificates/DB001.pdf)

Acesso a 14/09/2015

[14]

– [http://www.lgcstandards.com/medias/sys\\_master/pdfs/pdfs/h8c/hcc/8899313827870/NIM-GBW\\_09101B-ST-WB-CERT-1793605-1-1-1.pdf](http://www.lgcstandards.com/medias/sys_master/pdfs/pdfs/h8c/hcc/8899313827870/NIM-GBW_09101B-ST-WB-CERT-1793605-1-1-1.pdf)

Acesso a 14/09/2015

[15] – <http://www.cem.com/downloads390.html>

Acesso a 29/09/2014

[16] – <http://www.iproweb.fr/test/0%20-%20MATOS%20GUILLAUME/CEM%20-%20IPO%20technology%20-%20MARS%205/MARS5.pdf>

Acesso a 18/09/2015

[17] – [http://www.pynnco.com/Equipment\\_Consumable/MARS/XP-1500\\_CONTROL\\_VESSEL.html](http://www.pynnco.com/Equipment_Consumable/MARS/XP-1500_CONTROL_VESSEL.html)

Acesso a 18/09/2015

[18] – [http://www.pynnco.com/Equipment\\_Consumable/MARS/XP-1500\\_STANDARD\\_VESSEL.html](http://www.pynnco.com/Equipment_Consumable/MARS/XP-1500_STANDARD_VESSEL.html)

Acesso a 18/09/2015

[19] – [http://accp1.org/pharmacometrics/theory\\_gmp\\_model3.htm](http://accp1.org/pharmacometrics/theory_gmp_model3.htm)

Acesso a 19/09/2015

[20] – [http://www.erm-crm.org/ERM\\_products/search/reports/DB001.pdf](http://www.erm-crm.org/ERM_products/search/reports/DB001.pdf)

Acesso a 04/01/2015

[21] – <http://www.journey2dream.com/tissue-hair-mineral-analysis>

Acesso a 08/12/2014

[22] – <http://www.positivehealth.com/article/nutrition/hair-mineral-analysis>

Acesso a 08/12/2014

[23] – <http://www.adrenaladvice.com/labs/fern-2014-03-27-hair-ARL.pdf>

Acesso a 08/12/2014

[24] – [http://www.livingnetwork.co.za/files/hairtest\\_170.jpg](http://www.livingnetwork.co.za/files/hairtest_170.jpg)

Acesso a 08/12/2014

[25] – [http://www.livingnetwork.co.za/files/hairtest\\_1025.pdf](http://www.livingnetwork.co.za/files/hairtest_1025.pdf)

Acesso a 08/12/2014

[26] – [http://www.biolab.co.uk/docs/Hair\\_Mineral\\_Analysis.pdf](http://www.biolab.co.uk/docs/Hair_Mineral_Analysis.pdf)

Acesso a 08/12/2014

[27] – <http://www.biolab.co.uk/docs/rep-hair-analysis.pdf>

Acesso a 08/12/2014

## **7. Anexos**



## 7.1. Intervalos de referência para a concentração de vários elementos químicos em cabelo

Tabela 40 – Intervalos de concentração apresentados em vários artigos científicos para a concentração de vários elementos em cabelo humano

Referência	Ryan et al. (1978)	Ward et al. (1987) (Senofonte et al. 1989)			Caroli et al. (1992)	Caroli et al. (1994)	Senofonte et al. (2000)	Goullé et al. (2005)	Park et al. (2007)
<b>País</b>	Canadá	Inglaterra	Nova Zelândia	Bulgária	Itália	Vários países	Itália	Não especificado (França?)	Coreia do Sul
<b>População</b>	Indivíduos saudáveis				Crianças de uma área urbana com idade inferior a 15 anos	Várias populações	Crianças de uma área urbana com idade entre os 3 e 15 anos	Indivíduos saudáveis	Crianças entre os 3 e 6 anos de Seul e de pequenas cidades
<b>Amostra (dimensão)</b>	Adultos de ambos os sexos (42)	80 Indivíduos masculinos e 80 indivíduos femininos de idades entre 4 e 68 anos (160)	36 Indivíduos masculinos e 32 indivíduos femininos de idades entre 3 e 72 anos (68)	33 Indivíduos masculinos e 3 indivíduos femininos de idades entre 3 e 53 anos (36)	Crianças saudáveis de ambos os sexos estudantes em Roma (225)	Várias amostras (Indefinido)	Crianças saudáveis de ambos os sexos estudantes em Roma (137-412)	Não especificada (45)	Crianças saudáveis de ambos os sexos e sem tratamentos capilares (655)
<b>Técnicas analíticas usadas</b>	NAA				ICP-OES	Várias técnicas	ICP-OES	ICP-MS	ICP-MS
<b>Definição dos intervalos de referência</b>	Valor mínimo-Valor máximo				Dados entre os percentis de 5 e 95%	Não especificada	Dados entre os percentis de 5 e 95%	Dados entre os percentis de 5 e 95%	Dados entre os percentis de 5 e 95%

Elementos	Intervalos de concentração de referência (µg/g)								
<b>Li</b>		0,061-0,469	0,062-0,108	0,071-0,287		0,009-0,460		0,003-0,042	0,01-0,02
<b>Be</b>								0,003-0,012	
<b>B</b>						0,88-0,98		0,26-1,87	
<b>Na</b>	<7-199	55-445	30-80	45-465		20-2020			6-65
<b>Mg</b>		30,37-81,65	73,45-149,31	25,32-128,88	8,27-59,22	1,49-567	7,4-72,9		6-24
<b>Al</b>	1-17	1,790-9,430	6,157-10,833	2,693-21,236	2,5-20,5	0,1-36	2,4-20,0	0,26-5,30	3-16
<b>P</b>					88,9-327,7	88,9-773	96-299		90-155
<b>S</b>	27700-39900	31140-42700	31800-43000	30070-45600					
<b>K</b>		7,2-36,2	28,3-77,6	4,5-84,4		4-700			12-55
<b>V</b>	0,005-0,564	0,0110-0,0800	0,0191-0,0798	0,0125-0,3604	0,04-3,69	0,04-160	0,04-4,13	0,001-0,051	0,04-0,13
<b>Ca</b>	63-1501	150-1260	250-1380	170-1900	167,9-975,8	170-4690	149-1064		120-365
<b>Sc</b>		0,0029-0,0199	0,0061-0,0196	0,0021-0,0447					
<b>Cr</b>		0,026-1,883	0,560-1,919	0,205-1,023	0,085-2,54	0,08-2,50	0,08-4,56	0,11-0,52	0,20-0,90
<b>Mn</b>	0,030-3,724	0,208-3,976	0,573-1,679	0,201-4,301	0,043-1,11	0,04-24	0,04-0,77	0,016-0,57	0,10-0,60
<b>Fe</b>		5,17-38,68	18,45-52,80	12,94-96,36	5,79-37,47	10-900	5,9-36,8		7-21
<b>Co</b>		0,0120-0,1980	0,0415-0,0978	0,0317-0,1656	0,035-3,06	0,07-1,7	0,03-2,95	0,004-0,14	0,01-0,02
<b>Ni</b>		0,44-7,10	1,62-4,52	0,55-3,59	0,050-2,92	0,002-4,05	0,07-3,40	0,08-0,90	
<b>Cu</b>	4-245	4,57-19,41	3,42-18,12	7,21-19,39	7,17-89,40	6,0-293		9,0-61,3	8-36
<b>Zn</b>	108-357	141,90-259,60	157,64-293,19	143,82-284,39	53,7-230,2	53,7-327	64-228	129-209	30-130
<b>Ga</b>						1-250		0,002-0,068	
<b>Ge</b>								0,001- 0,039	
<b>As</b>		0,101-2,410	0,279-1,049	0,037-0,625	0,01-0,27	0,03-25	0,14-0,24	0,03-0,08	0,05-0,20
<b>Se</b>	0,24-87,54	0,340-2,830	0,233-1,047	0,418-2,448	0,26-1,52	0,002-6,6	0,30-1,51	0,37-1,37	0,50-1

<b>Rb</b>		0,105-0,814	0,259-0,655	0,145-0,894		0,06-5,34		0.003-0,03	
<b>Sr</b>		0,055-0,351	0,087-0,216	0,064-0,256		1,7-860	0,31-3,65	0.17-4,63	
<b>Zr</b>									
<b>Mo</b>		0,0270-0,1690	0,1021-0,2123	0,0105-0,0662	0,043-1,42	0,03-2,16	0,04-0,98	0.01-0,028	0,04-0,10
<b>Pd</b>						<0,02		0.004-0,049	
<b>Ag</b>						0,16-0,7		0.02-1,31	
<b>Cd</b>		0,112-0,994	0,361-1,506	0,561-2,708	0,041-0,52	0,04-5,3	0,04-0,61	0.004-0,17	0,01-0,20
<b>Sn</b>		0,150-1,860	0,427-1,032	0,561-1,982		0,036-8,30		0.007-0,34	
<b>Sb</b>		0,024-0,114	0,024-0,265	0,058-0,259		0,05-0,06		0.003-0,13	
<b>Te</b>								0.0003-0,001	
<b>Cs</b>		0,102-1,111	0,332-0,565	0,299-2,453		0,05-1			
<b>Ba</b>		0,470-4,030	0,201-0,541	1,829-10,935		0,76-1,41		0.05-1,58	0,10-0,70
<b>Ce</b>		0,018-0,098	0,016-0,087	0,021-0,105					
<b>La</b>		0,011-0,113	0,046-0,137	0,012-0,120					
<b>W</b>		0,0026-0,0148	0,0028-0,0167	0,0032-0,0193				0.0001-0,007	
<b>Pt</b>						<0,05		0.0004-0,0008	
<b>Au</b>	0,001-0,175	0,0084-0,1008	0,0369-0,0572	0,0130-0,2288					
<b>Hg</b>		0,5330-4,720	1,495-2,809	1,004-8,074		0,3-12,2		0.31-1,66	0-1
<b>Ti</b>		1,115-8,935	1,420-8,388	2,154-5,844	0,13-2,64	0,13-12	0,11-2,17		
<b>Tl</b>								0.0001-0,0004	
<b>Pb</b>					1,13-21,1	0,004-95	1,0-19,8	0.13-4,57	<3
<b>Bi</b>								0.0004-0,14	0-0,10
<b>U</b>								0.002-0,03	0-0,14

Tabela 41 – Requisitos, técnicas analíticas e valores de concentração de referência de vários laboratórios comerciais para a quantificação multielementar em cabelo humano

Laboratório comercial	Trace Elements, Inc.	Analytical Research Labs, Inc.	Anamol Laboratories	Doctor's Data Inc.	Biolab	Laboratório “A” (Proteção de identidade)	Laboratório “B” (Proteção de identidade)
País	E.U.A.		Canadá		Reino Unido	Coreia do Sul	
Referências	[21]	[22], [23]	[24]	[25]	[26], [27]	Namkoong et al. (2013)	
Técnica analítica	ICP-MS	ICP-MS	Não especificada	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	
Tipo de paciente	Mulher de 47 anos	Homem de 47 anos	Mulher de 42 anos	Homem de 22 anos	Homem de 29 anos	Homem de 23 anos	
Ano do boletim de análise considerado	2012	2014	2006	2014	2012	2011	
Amostra requerida (mg)	Não especificada	Não especificada	Não especificada	200	500	60	
Definição dos intervalos de referência	Não especificada	Não especificada	Média ± 2s (≈95% dos dados)	Média ± s (≈68% dos dados)	Não especificada	Não especificada	
Elementos	Intervalos de concentração de referência (µg/g) (indivíduos saudáveis)						
Li	0,01-0,06	1,2-3	0,01-0,2	0,007-0,020		0,01-0,12	0,01-0,2
Be	<0,01		<0,05	<0,020		<0,02	
B	0,2-9,1	0,5-3	0,5-3,5	0,4-3		0,1-10	
Na	40-360	125-450	18-85	20-180	50-1000	40-480	18-85
Mg	20-110	40-120	44-98	25-75	60-160	15-115	18-78
Al	<18	<8	<10	<7,0	<50	<16	<10
Si			5-28				
P	110-200	128-192	145-250	150-220	100-200	130-220	145-250
S	35460-53360		30000-55000	44000-50000		35000-55000	30000-55000
K	20-240	50-180	5-40	9-80	50-300	10-206	5-40
V	0,2-1,4		0,02-0,1	0,018-0,065		0,01-0,3	0,02-0,1
Ca	220-970	280-800	450-1105	200-750	200-2800	190-738	180-760
Cr	0,2-0,8	0,9-1,6	0,2-1,2	0,4-0,7	0,10-1,50	0,23-0,86	0,2-1,2
Mn	0,1-1,3	0,25-0,6	0,2-0,8	0,08-0,5	0,20-2,00	0,2-0,8	0,2-0,8
Fe	5-16	21,0-45,5	3,94-7,36	7,0-16	5,0-30,0	7-21	6-15



<b>Co</b>	0,01-0,03	0,3-0,6	0,03-0,05	0,004-0,020	0,01-0,20	0-0,1	0,01-0,05
<b>Ni</b>	<1	0,75-1,5	0,1-1	<0,2	<1,40		
<b>Cu</b>	9-39	15,0-32,5	18-50	11-30	10-100	5-27	15-35
<b>Zn</b>	100-210	150-250	150-250	130-200	160-240	81-175	150-250
<b>Ga</b>							
<b>Ge</b>	0,06-0,11		0,04-0,1	0,030-0,040		0-0,2	
<b>As</b>	<0,2	<0,3	<1	<0,080	<1,0	<0,5	<1
<b>Se</b>	0,3-1,8	1,20-2,25	0,5-2	0,70-1,2	0,40-2,00	0,55-3,75	0,6-1,6
<b>Rb</b>	<0,19			0,011-0,12			
<b>Sr</b>	0,3-5		0,8-12	0,30-3,5			0,6-7
<b>Zr</b>	<0,9		<0,5	0,020-0,44			
<b>Mo</b>	0,03-0,08	0,8-1,6	0,04-0,15	0,025-0,060		0,01-0,4	0,02-0,1
<b>Pd</b>			<1				
<b>Ag</b>			<1	<0,08			
<b>Cd</b>	<1,4	<0,2	<0,5	<0,065	<0,10	<0,1	0,15
<b>Sn</b>	<0,3		0,3-1,6	<0,3		0-0,6	
<b>Sb</b>	<0,07		<0,6	<0,066		<0,05	
<b>I</b>			0,8-1,6	0,25-1,8			
<b>Cs</b>							<0,01
<b>Ba</b>	<2,6		<1,5	<1,0		<2	<1,5
<b>W</b>	<0,11		<2				
<b>Pt</b>	<0,02			<0,005			
<b>Hg</b>	<1,8	<2	<1	<0,8	<1,00	<1,1	<1
<b>Ti</b>	<2			<0,6			
<b>Tl</b>	<0,06		<1,5	<0,002			
<b>Pb</b>	<3	<7,5	<1,5	<0,80	<2,00	<2	<2
<b>Bi</b>	<0,39		<1	<2,0		<0,5	<1
<b>Th</b>				<0,002			
<b>U</b>	<0,17		<1,5	<0,060		<0,5	<1

Razões entre elementos	Valores de referência						
Na/K	1,4-3,4	2,50	0,5-12	0,5-10	0,4-3,4		
Na/Mg	2-5	4,17					
Ca/Mg	3-11	6,67	4,0-25,1	4-30	3,6-36,3		
Ca/K	2,2-6,2	4,00					
Ca/P	1,6-3,6	2,50		0,8-8	1,8-21,3		
Fe/Cu	0,2-1,6		0,1-0,4				
Zn/Mn			147-1250				
Zn/Cu	4-12	8,00	3-13,9	4-20	2,1-18,1		
S/Cd	>71126			>800			
S/Hg	>28450						
S/Pb	>5690						
Ca/Pb	>84,0						
Fe/Pb	>4,4						
Fe/Hg	>22						
Zn/Cd	>500				>1989		
Zn/Hg	>200						
Zn/Pb					>104		
Se/Cd					>5,8		
Se/Hg	>0,8				>0,5		

## 7.2. Procedimentos de lavagem/preparação de amostras de cabelo

Tabela 42 – Compilação de alguns dos procedimentos de lavagem de cabelo referidos na literatura científica

Referências	Procedimento	Elementos	Comentários
<b>Ryabukhin (1976), Cortes Toro et al. (1993)</b>	1× acetona; 3× água; 1× acetona ( <b>Método da IAEA</b> )	Todos os elementos analisáveis (não são especificados)	Solventes com alta pureza. Lavagem de 10 minutos com agitação mecânica ou manual e porções de solvente de 25 mL. Colocar a amostra entre duas folhas de papel de filtro e deixar secar à temperatura ambiente, num ambiente livre de poeiras (preferencialmente, uma câmara e fluxo laminar). Se for necessário determinar a% por massa seca, secar uma alíquota em separado (16 horas a 110 °C)
<b>Hilderbrand et al. (1974)</b>	2× solução de <i>Snoop</i> (detergente sem iões) a 10%	Ca, Cu, Mg Zn	Todos os procedimentos de lavagem indicados foram aplicados a amostras de 0,1 a 0,5 g e finalizados da seguinte forma: Enxaguadela 3× com água bidestilada; secagem a 75 °C; arrefecimento até à temperatura ambiente num exsiccador
	2× solução de detergente de laboratório 10 g/dL		
	imersão durante 5 minutos numa solução de EDTA 10 g/dL com agitação ocasional		
	1× água a ferver		
<b>Assarian et al. (1977)</b>	1× solução de heptano; 3× etanol a 95% (30 minutos) com agitação de	Cu, Mg, Zn	Amostra de 0,5 g de cabelos. Para todos os procedimentos verificaram-se diferenças significativas nas concentrações, comparativamente ao verificado em amostras não sujeitas a lavagem. A concentração de Mg foi a mais afetada e passou para aproximadamente metade em todos os procedimentos. A lavagem com detergente removeu grande parte do Zn e Mg. A lavagem com acetona e éter removeu grande parte do Cu.
	2× laurilsulfato de sódio a 1% (m/v) (30 minutos cada); 3× água desionizada (30 minutos cada); secagem numa estufa a 60 °C, durante 24 horas		
	1× hexano (30 minutos); 3× solução de etanol e água 95:5 (v/v) (30 minutos cada); 1× água desionizada (30 minutos)		
<b>(Salmela et al. (1981))</b>	1× acetona (10 minutos); 1× éter etílico anidro (10 minutos); 1× acetona (10 minutos); 1× laurilsulfato de sódio em banho de água a 30 °C (10 minutos); 3× água desionizada (30 minutos cada); 1× acetona (10 minutos); secagem numa estufa a 60 °C, durante 24 horas	Cd, Cu, Fe, Mn, Zn	Amostras de 0,6 g de cabelos cortados com tamanhos entre 2 e 3 mL, misturados num papel de filtro com uma vareta de vidro. Lavagens realizadas em tubos de ensaio de 50 mL fechados colocados num agitador mecânico, à temperatura ambiente e com o mínimo de agitação. Volume de solvente e duração total: 30 mL e 20 minutos. Todos os procedimentos de lavagem aplicados foram finalizados com uma enxaguadela com água bidestilada (3×) e secagem a 105 °C
	1× hexano a 95% (30 mL, 20 minutos); secagem a 75° C; Triton X-100 a 1%		
	1× hexano a 95% (30 mL, 20 minutos); Laurilsulfato de sódio a 1%		
	1× hexano a 95% (30 mL, 20 minutos); EDTA a 1%		
<b>Cargnello et al. (1995)</b>	Acetona (método da IAEA modificado)	Não especificados	Amostra: 30 a 50 fios de cabelo. Secagem num exsiccador de plástico limpo, numa câmara de fluxo laminar. Não são
	Shampoo comercial – 1× shampoo comercial diluído 4× com água da torneira; 1× água da torneira + ultrassons (20 minutos)		

	Lavagem sequencial – 1× etanol ultrapuro + ultrassons (20 minutos); imersão com clorofórmio ultrapuro com agitação ligeira; 1× água ultrapura + ultrassons (20 minutos)		apresentados resultados quantitativos. Contudo, através de estudos com microscopia eletrônica, os autores indicam que, embora todos os métodos tenham removido parte da contaminação superficial, nenhum deles removeu totalmente essas contaminações.
	Água bidestilada – 1× água bidestilada; 1× água bidestilada + ultrassons (20 minutos);		
	1× solução de clorofórmio e etanol 1:1; agitação durante 10 minutos.		
	Método da IAEA (modificado) – Lavagem com acetona de alta pureza e aplicação de ultrassons (30 minutos); enxaguadela com água ultrapura (2×); repetição de todo o processo, finalizando com uma passagem de água ultrapura e aplicação de ultrassons (30 minutos)		
<b>Borella et al. (1996)</b>	1× Triton X-100 (30 minutos); 1× água bidestilada	Ca, Cd, Cr, Cu, K, Mg, Pb, Se, Zn	Amostras de 0,5 g. Agitação com 150 mL de solvente em frascos de 250 mL, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Secagem à temperatura ambiente
	1× laurilsulfato de sódio a 1% (1,5 minutos); 1× água bidestilada		Amostras de 0,5 g. Secagem à temperatura ambiente.
	1× EDTA a 5%; 1× água bidestilada.		
	4× 100 mL de uma mistura acetona/metanol 1:1 (v/v) durante 20 minutos (cada); 1× com água bidestilada.		
	Método da IAEA (modificado) – 100 mL de cada um dos solventes (acetona e água) 4× (5 minutos) água bidestilada em banho de ultrassons.		
<b>Morton et al. (2002)</b>	1% (m/v) de EDTA	As, Cd, Cr, Hg, Pb, Sb, Se	Remoção significativa de todos os elementos, à exceção de Hg e Se.
	0,1 M de HCl		Remoção significativa de Cd e Pb
	Shampoo comercial (sem selênio)		Remoção significativa de Cd, Cr e Pb
	0,1% (v/v) de HNO <sub>3</sub>		Remoção pouco significativa de todos os elementos avaliados
	Isopropanol		
	1% (v/v) de Triton X-100 (com e sem a aplicação posterior de um solvente orgânico)		
	1% (v/v) de SLS		
	Água ultrapura		
	Método da IAEA		
<b>(Suzuki et al. 2004)</b>	1× detergente neutro diluído 100×; 1× água destilada; passagem de uma pequena quantidade de acetona (para remover a água); remoção da acetona a pressão reduzida; corte da amostra, de forma a que se assemelhe a um pó	Hg	Quantidade de amostra: 0,02-0,03 g. Procedimento específico para mercúrio
<b>Kempson et al. (2012)</b>	1× Triton X-100 a 2% (30 minutos); 3× água destilada durante 10 minutos (cada)	Ca, Fe, K, Mg, Na	Os dois métodos de lavagem estudados apresentam tendências semelhantes. Todos os elementos avaliados parecem ser removidos tanto do interior do cabelo como da superfície exterior, à exceção do Fe. No caso do Fe, apenas o conteúdo interno parece ter variado significativamente.
	Método da IAEA		

### **7.3. Modelo de inquérito**

Nas páginas seguintes é apresentado um modelo de inquérito elaborado para entrega nos salões de cabeleireiro onde serão recolhidas amostras de cabelo. Este inquérito tem como objetivo dotar o LCA da informação necessária para futuros trabalhos de investigação envolvendo estudos de relação entre as características dos indivíduos dadores das amostras de cabelo e a concentração dos vários elementos quantificáveis nessas amostras. Tentou-se, dentro do possível, elaborar um inquérito com uma extensão aceitável, que abrangesse os principais fatores que, de acordo com a literatura científica, influenciam a concentração de elementos em cabelo. A título de exemplo, em Chojnacka *et al.* (2012) é feita uma revisão de alguns dos fatores que influenciam a concentração de vários elementos em cabelo e é apresentado um modelo de inquérito, que foi considerado para a elaboração do inquérito apresentado neste documento.

## **Inquérito – Estudo da concentração de metais em cabelos**

### **➤ Apresentação da entidade proponente deste inquérito/Declaração sobre a confidencialidade das informações apresentadas neste inquérito**

O presente inquérito faz parte de um estudo científico desenvolvido no âmbito de uma dissertação de mestrado de um aluno da Universidade de Aveiro (UA), com o título “Validação de um método de análise de cabelo por ICP-MS e ICP-AES”. Esse trabalho será desenvolvido ao longo do atual ano-letivo (2014-2015), no contexto de um estágio no Laboratório Central de Análises (LCA), uma unidade executiva da UA, responsável pela execução e fornecimento de serviços de análise solicitados por entidades internas e externas à UA.

Ao preencher e entregar este inquérito ao seu cabeleireiro(a), autoriza-o a recolher uma amostra dos seus cabelos para uso no estudo referido. Caso seja menor de idade, é necessária autorização do pai/mãe/encarregado de educação/tutor ou irmão/irmã (desde que este seja maior de idade) para a recolha da amostra de cabelo e sua entrega com o respetivo inquérito. Nesses casos, e de forma a garantir a confidencialidade das informações recolhidas, caso o responsável pelo menor não deseje assinar a autorização, mas permita que as informações recolhidas sejam incluídas no estudo, deverá comunicar essa informação ao seu cabeleireiro(a), que será o responsável por verificar/comunicar a autorização.

As informações que fornecer através do preenchimento deste inquérito destinar-se-ão exclusivamente à interpretação de resultados obtidos no estudo referido e os seus dados pessoais não serão fornecidos a terceiros, sem o seu consentimento prévio. Todas as conclusões decorrentes das informações recolhidas através destes inquéritos serão apresentadas de forma a proteger a identidade de todos os participantes. A sua identificação neste inquérito é opcional. Caso opte por se identificar e indicar o seu contacto, esses dados destinar-se-ão exclusivamente a eventuais contactos posteriores, com vista a informar o participante relativamente a resultados, decorrentes das análises efetuada às amostras recolhidas, que revelem poder ser de interesse para o dador, ou à recolha de informação adicional que se revele necessária.

Por favor, preencha este inquérito de forma séria, fornecendo apenas informações verdadeiras. Agradecemos que indique o máximo de informação possível e ainda qualquer informação adicional que considere pertinente no contexto do estudo indicado. Não tenha receios relativamente às informações prestadas, uma vez que, salvo indicação em contrário por parte de algum participante, garantimos o anonimato das informações apresentadas.

Caso pretender esclarecer alguma dúvida ou obter informação adicional, poderá estabelecer contacto usando o e-mail: cesar.tavares@ua.pt

**Desde já, obrigado pela sua colaboração!**

---

**Nota:** Todos os *itens* identificados com “\*” são de preenchimento opcional. Todos os outros campos deverão ser preenchidos.

### **➤ 1. (A preencher pelo(a) cabeleireiro(a))**

**Data da recolha:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ **Salão:**\_\_\_\_\_ **Nº da amostra:**\_\_\_\_\_

**Altura aproximada do corte para recolha da amostra (desde a superfície da cabeça):**  
\_\_\_\_\_mm

### **➤ 2. Identificação do dador**

**Nome\*:** \_\_\_\_\_

**Contacto (telefone, telemóvel e/ou e-mail)\*:** \_\_\_\_\_

**Idade:** \_\_\_\_\_ **Sexo:** Feminino ☐ Masculino ☐

**Nacionalidade:** \_\_\_\_\_

### **➤ Perfil do consumo de alimentos e bebidas**

**Qual o seu consumo médio semanal dos seguintes tipos de alimentos?**

**Consumo de carne:** \_\_\_\_ vezes por semana

**Consumo de peixe:** \_\_\_\_ vezes por semana

**Vegetais/Frutos produzidos na região de residência:** \_\_\_\_ vezes por semana

**Vegetariano** ☐

**Que tipo de água costuma consumir?** Engarrafada ☐ Rede (municipal) ☐  
Poço ☐ Fonte natural ☐ Outra ☐ Qual? \_\_\_\_\_

**Frequência semanal do consumo de bebidas alcoólicas?**

Nunca ☐ Ocasionalmente ☐ Frequentemente ☐

Por favor, indique detalhes adicionais relativamente ao consumo de bebidas alcoólicas (tipos de bebidas, frequência, etc.):



### **3. Perfil de saúde**

**Fumador?** Sim ☐ Não ☐

Ocasionalmente (menos de um cigarro por dia) ☐

Se respondeu negativamente à questão anterior, indique se vive ou tem qualquer outro tipo de contacto frequente com fumadores (exposição passiva ao fumo do tabaco): \_\_\_\_\_

**É consumidor de qualquer outro tipo de drogas? Se sim, indique quais e com que regularidade?\***

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Tem algum problema de saúde (diabetes, hipertensão, autismo, depressão, asma, alergias, problemas de visão, doenças autoimunes, etc.)? Indique quais e há quanto tempo foi(foram) diagnosticado(s).**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Qual a medicação que costuma consumir? (Considere o último ano e, caso tenha indicado alguma patologia na pergunta anterior, faça a associação entre o(s) medicamento(s) referido(s) e a(s) e a(s) respetiva(s) doenças.)**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Possui algum tipo de aparelho ortodôntico (aparelho dentário), amálgamas dentárias (“chumbos”) ou coroas dentárias? Se sim, indique quais.**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

➤ **4. Perfil da área de residência**

Área de residência atual: \_\_\_\_\_

Áreas de residência anteriores (se aplicável) (últimos 3 anos – indicar quais e período de tempo correspondente; exemplo: Maputo (2012-2013)):

\_\_\_\_\_

➤ **5. Perfil laboral**

Profissão atual: \_\_\_\_\_ Desempregado ☐ Reformado ☐

Há quanto tempo desempenha a profissão referida (ou está desempregado, ou é reformado)?

\_\_\_\_\_

Por favor, indique a sua área de trabalho (exemplos: zona industrial de Estarreja, área rural, Aveiro, Porto, etc.):

\_\_\_\_\_

Por favor, indique se desempenhou outras profissões e os períodos correspondentes (nos últimos 3 anos – exemplo: construtor civil (2011-2012)):

\_\_\_\_\_

Em alguma das profissões referidas tem/teve contacto frequente com produtos químicos (exemplos: metais, lixívia, ácidos, tintas, solventes etc.)? Sim ☐ Não ☐

Se respondeu afirmativamente à questão anterior, indique quais as substâncias:

\_\_\_\_\_

➤ **6. Tipo de cabelo**

**Nota:** Para o preenchimento desta secção, caso tenha dúvidas, solicite a ajuda do seu cabeleireiro(a).

**Grupo étnico:** Caucasiano (Branco) ☐ Africano (Negro) ☐ Asiático ☐

**Tipo (estado natural):**

Liso ☐ Ondulado ☐ Crespo/Encaracolado ☐ Carapinha ☐

Seco ☐ Normal ☐ Oleoso ☐

Fino ☐ Médio ☐ Grosso ☐

Caspa? Sim ☐ Não ☐

**Cor natural dos cabelos:** Loiros ☐ Ruivos ☐ Castanhos ☐ Pretos ☐

➤ **7. Cuidados com os cabelos**

Recentemente, procedeu a algum tipo de tratamento capilar que altere a cor natural do seu cabelo? Sim ☐ Não ☐



**Se respondeu afirmativamente à questão anterior, indique qual o tratamento:**

Descoloração ☐

Coloração ☐

Todo o cabelo ou apenas madeixas? \_\_\_\_\_

**Recentemente, procedeu a algum outro tipo de tratamento capilar que altere o aspeto do seu cabelo?** Sim ☐ Não ☐

**Se respondeu afirmativamente à questão anterior, indique qual o tratamento:**

Frisagem ☐

Desfrisagem ☐

Permanente ☐

Rastas ☐

Extensões ☐

Outro(s) ☐ (Indicar qual/quais): \_\_\_\_\_

**Usa frequentemente secador e/ou alisador/encaracolador de cabelo?** Sim ☐ Não ☐

Se sim, indique a frequência média com que usa: \_\_\_\_\_

**Indique outros dados que considere relevantes** (exemplo: uso frequente de gel, shampoos anticaspa, etc.):  
\_\_\_\_\_

**Nº de médio semanal de lavagens do cabelo:** \_\_\_\_\_

➤ **8. Autorização (menores)**

**Autorizo a que o presente inquérito e amostra correspondente sejam incluídos no estudo indicado.** Sim ☐ Não ☐


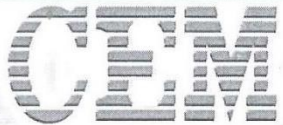
Assinatura do responsável\*: \_\_\_\_\_

Verificação (assinatura do(a) cabeleireiro(a)): \_\_\_\_\_

**Muito obrigado pela sua contribuição!**



## 7.4. Procedimento de digestão usado como referência

Hair



### Application Note for Acid Digestion

Sample Type: Hair  
Sample Category: Food / Plant / Animal Tissue

#### Sample Preparation Procedure

Sample Weight: 0.25g  
Reagents: 10mL Conc.  $\text{HNO}_3$

#### Recommended Equipment



**MARS**      **XP1500Plus**

This method is appropriate for use with  
XP1500Plus : HP500Plus : Xpress : Omni

#### Microwave Heating Program

Control Style : Ramp to Temperature

Stage	Power		Ramp Time mm:ss	Pressure (psi - limit)	Temp °C	Stir	Hold Time mm:ss
	Level*	%					
1	400W	100	15:00	800	180	Off	15:00


\*Power level shown by IEC procedure as 400W, 800W, 1600W. Older units may show power levels as 300W, 600W, 1200W

**Notes:**

1. If using a vessel other than the recommended choice, adjust sample size and pressure limit to values appropriate for the vessel chosen.

**General Precautions:**

- a) This procedure is a reference point for sample digestion using a CEM system and may need to be modified or changed to obtain the required results on your sample.
- b) The control / reference vessel must contain the largest and most reactive sample.
- c) Manual venting of CEM vessels should be performed when wearing hand/eye/body protection and when the vessel contents are at or below room temperature to avoid the potential for chemical burns. Always point the vent hole away from the operator.
- d) Power level should be adjusted with respect to the number of vessels. Guidelines for framed vessels are:  
1-2 Vessels (400W), 3-6 Vessels (800W), 7 or more Vessels (1600W)



P.O. Box 200 Matthews, NC 28106 • 800.726.3331 • [www.cem.com](http://www.cem.com)

 $\text{HNO}_3$

Figura 76 – Nota técnica da CEM que foi usada como referência no desenvolvimento do procedimento de digestão usado neste trabalho

## 7.1. Valores de referência indicados nos vários materiais usados no controlo de qualidade externo

Tabela 43 – Concentrações de referência em algumas das soluções aquosas usadas como padrões de verificação da função de calibração (PVFC) neste trabalho

Elementos	RELACRE junho 2012				RELACRE julho 2014				NIST SRM 1643e		
	$C_{ref}$ (µg/L)	$S_{ref}$ (µg/L)	$U$ (µg/L)	$U/C_{ref}$ (%)	$C_{ref}$ (µg/L)	$S_{ref}$ (µg/L)	$U$ (µg/L)	$U/C_{ref}$ (%)	$C_{ref}$ (µg/L)	$U$ (µg/L)	$U/C_{ref}$ (%)
Be	10	1	3	30,0	14	1	3	21,4	13,98	0,2	1,2
B	113	8	20	17,7	522	35	70	13,4	157,9	3,9	2,5
Na	14000	1000	300	2,1	8000	300	800	10,0	20740	260	1,3
Mg	2900	100	300	10,3	4700	200	400	8,5	8037	98	1,2
Al	137	10	20	14,6	183	13	30	16,4	141,8	8,6	6,1
K	2400	100	300	12,5	1800	100	300	16,7	2034	29	1,4
Ca	12000	1000	300	2,5	24000	1000	300	1,3	32300	1100	3,4
V	7,1	0,5	0,9	12,7	19	2	3	15,8	37,86	0,59	1,6
Cr	50	4	6	12,0	21	2	3	14,3	20,4	0,24	1,2
Mn	32	3	4	12,5	1,4	0,5	0,8	57,1	38,97	0,45	1,2
Fe	262	18	40	15,3	415	28	50	12,0	98,1	1,4	1,4
Co	6	0,4	0,7	11,7	13	1	3	23,1	27,06	0,32	1,2
Ni	29	2	4	13,8	13	1	3	23,1	62,41	0,69	1,1
Cu	286	20	40	14,0	615	41	80	13,0	22,76	0,31	1,4
Zn	105	7	20	19,0	73	5	9	12,3	78,5	2,2	2,8
As	20	1	3	15,0	10	1	3	30,0	60,45	0,72	1,2
Se	12	1	3	25,0	8,1	0,6	1	12,3	11,97	0,14	1,2
Rb									14,14	0,18	1,3
Sr	83	6	10	12,0	308	21	40	13,0	323,1	3,6	1,1
Mo	4,1	0,3	0,5	12,2	10	1	3	30,0	121,4	1,3	1,1
Ag									1,062	0,075	7,1
Cd	4,2	0,3	0,5	11,9	4	0,3	0,5	12,5	6,568	0,073	1,1
Sb	4,2	0,3	0,5	11,9	4,5	0,3	0,3	6,7	58,3	0,61	1,0
Ba	65	5	8	12,3	102	7	20	19,6	544,2	5,8	1,1
Pb	18	2	3	16,7	19	2	3	15,8	19,63	0,21	1,1

**Nota** – Nas colunas em que são indicados valores de incerteza expandida relativa, os sombreados a verde, amarelo, laranja e vermelho destacam, respetivamente, as incertezas expandidas relativas inferiores a 10%, entre 10% e 15%, entre 15% e 20% e superiores a 20%

**Tabela 44 – Valores de concentração teóricos de vários elementos nos MRC de cabelo usados neste trabalho.** Os valores com indicação da incerteza expandida (*U*) correspondem a concentrações certificadas, e os restantes a concentrações de referência.

Elementos *	ERM DB001			GBW 09101b		
	<i>C<sub>ref</sub></i> (µg/g)	<i>U</i> ** (µg/g)	<i>U/C<sub>ref</sub></i> *** (%)	<i>C<sub>ref</sub></i> (µg/g)	<i>U</i> ** (µg/g)	<i>U/C<sub>ref</sub></i> *** (%)
<b>Li</b>	0,048					
<b>Be</b>	0,0029					
<b>B</b>	3,1					
<b>Na</b>				445	40	9,0%
<b>Mg</b>	63,5			248	14	5,6%
<b>Al</b>	18,1			23,2	2	8,6%
<b>P</b>	142,2			174	43	24,7%
<b>S</b>	52300			46200		
<b>Cl</b>				48,2		
<b>K</b>				14,4		
<b>Ca</b>	1028			1537	68	4,4%
<b>Sc</b>	0,0033					
<b>Ti</b>	109			2,1		
<b>V</b>	0,0493			0,089		
<b>Cr</b>	0,5			8,74	0,97	11,1%
<b>Mn</b>	0,442			3,83	0,39	10,2%
<b>Fe</b>	22,6			160	16	10,0%
<b>Co</b>	0,106			0,153	0,015	9,8%
<b>Ni</b>	0,78			5,77		
<b>Cu</b>	33	4	12,1%	33,6	2,3	6,8%
<b>Zn</b>	209	12	5,7%	191	16	8,4%
<b>As</b>	0,044	0,006	13,6%	0,198	0,023	11,6%
<b>Se</b>	3,24	0,24	7,4%	0,59	0,04	6,8%
<b>Br</b>	4,76			0,59		
<b>Sr</b>				8,17	0,69	8,4%
<b>Y</b>	0,053					
<b>Zr</b>	0,064					
<b>Nb</b>	0,0036					
<b>Mo</b>	0,2			1,06	0,12	11,3%
<b>Ag</b>	0,39			0,037	0,002	5,4%
<b>Cd</b>	0,125	0,007	5,6%	0,072	0,01	13,9%
<b>Sn</b>	0,44					
<b>Sb</b>	0,128			0,12	0,02	16,7%
<b>I</b>				0,96	0,2	20,8%
<b>Cs</b>	0,0012					
<b>Ba</b>	0,9			11,1	1,3	11,7%
<b>La</b>				0,029		
<b>Hf</b>	0,00207					
<b>W</b>	0,0152					
<b>Re</b>	0,00015					
<b>Au</b>	0,0128					
<b>Hg</b>	0,365	0,028	7,7%	1,06	0,28	26,4%
<b>Tl</b>	0,00048					
<b>Pb</b>	2,14	0,2	9,3%	3,83	0,18	4,7%
<b>Bi</b>	0,009					
<b>Th</b>	0,0034					
<b>U</b>	0,0101					

Notas: \* → Os elementos a negrito correspondem aos elementos incluídos no grupo final de analitos para a validação;

\*\* → Fator de expansão  $k = 2$ , correspondente a um nível de confiança de 95 %.

\*\*\* → Os sombreados a verde, amarelo, laranja e vermelho destacam, respetivamente, as incertezas expandidas relativas inferiores a 10%, entre 10% e 15%, entre 15% e 20% e superiores a 20%

## 7.1. Resultados obtidos na validação do sistema analítico

### 7.1.1. Avaliação da linearidade de uma das funções de calibração obtidas na análise de Pb por ICP-MS

Para ilustrar o procedimento de avaliação da linearidade das funções de calibração, nesta secção são apresentadas as tabelas criadas em *Microsoft Excel* para essa finalidade, considerando os resultados obtidos a 25/05/2015 na quantificação de Pb por ICP-MS nos padrões de calibração. As duas células assinadas a cinzento na **Tabela 45** correspondem à exclusão da leitura correspondente, que foi realizada devido à instabilidade na quantificação associada ao fim de vida do detetor.

Tabela 45 – Cálculos para a definição dos modelos pesados de calibração (linear e quadrático) da análise de Pb por ICP-MS realizada a 25/05/2015

Padrões	Dados experimentais				Cálculos para aplicação dos modelos pesados de calibração					
	Conc. (µg/L)	Sinal (Contagens por segundo – cps )			$k_i$	Sinal médio	$s_i$	$s_i^2$	$1/s_i^2$	$w_i$
P0	0,00	2259	2403		2	2,3E+03	1,0E+02	1,0E+04	9,8E-05	4,1E+00
P1	1,08	25188	25063	24915	3	2,5E+04	1,4E+02	1,9E+04	5,4E-05	2,3E+00
P1,5	1,60	36427	36557	36604	3	3,7E+04	9,2E+01	8,4E+03	1,2E-04	5,0E+00
P2	2,13	48630	48751	47730	3	4,8E+04	5,6E+02	3,1E+05	3,2E-06	1,3E-01
P2,5	2,65	60377	59914	60446	3	6,0E+04	2,9E+02	8,4E+04	1,2E-05	5,0E-01
P10	10,93	259205	259568	262707	3	2,6E+05	1,9E+03	3,7E+06	2,7E-07	1,1E-02
P20	21,17	494244	498344	500255	3	5,0E+05	3,1E+03	9,4E+06	1,1E-07	4,4E-03
P30	31,06	729636	724079	726456	3	7,3E+05	2,8E+03	7,8E+06	1,3E-07	5,4E-03
P40	41,80	960605	975647	975576	3	9,7E+05	8,7E+03	7,5E+07	1,3E-08	5,6E-04
P50	52,40	1229727	1237689	1229729	3	1,2E+06	4,6E+03	2,1E+07	4,7E-08	2,0E-03
P80	78,47	1836356		1827355	2	1,8E+06	6,4E+03	4,1E+07	2,5E-08	1,0E-03
P100	108,41	2511135	2522446	2519103	3	2,5E+06	5,8E+03	3,4E+07	3,0E-08	1,2E-03
Soma	3,5E+02	8,2E+06	6,4E+06	8,2E+06	3,4E+01	8,2E+06	3,4E+04	1,9E+08	2,9E-04	1,2E+01
Média	2,9E+01	6,8E+05	5,3E+05	6,8E+05	2,8E+00	6,8E+05	2,9E+03	1,6E+07	2,4E-05	1,0E+00

Tabela 45 (continuação) – Cálculos para a definição dos modelos pesados de calibração (linear e quadrático) da análise de Pb por ICP-MS realizada a 25/05/2015

Cálculos para aplicação dos modelos pesados de calibração							(Modelo quadrático)		
$w_i \times x_i$	$(w_i \times x_i)^2$	$w_i \times y_i$	$(w_i \times y_i)^2$	$w_i \times x_i \times y_i$	$w_i \times x_i^2$	$w_i \times y_i^2$	$w_i \times (x_i^3)$	$w_i \times (x_i^4)$	$w_i \times (x_i^2) \times y_i$
0,0E+00	0,0E+00	9,5E+03	9,1E+07	0,0E+00	0,0E+00	2,2E+07	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
2,4E+00	6,0E+00	5,6E+04	3,2E+09	6,1E+04	2,6E+00	1,4E+09	2,9E+00	3,1E+00	6,6E+04
8,0E+00	6,4E+01	1,8E+05	3,3E+10	2,9E+05	1,3E+01	6,7E+09	2,1E+01	3,3E+01	4,7E+05
2,9E-01	8,2E-02	6,5E+03	4,2E+07	1,4E+04	6,1E-01	3,2E+08	1,3E+00	2,8E+00	3,0E+04
1,3E+00	1,8E+00	3,0E+04	9,1E+08	8,0E+04	3,5E+00	1,8E+09	9,3E+00	2,5E+01	2,1E+05
1,2E-01	1,5E-02	2,9E+03	8,7E+06	3,2E+04	1,4E+00	7,7E+08	1,5E+01	1,6E+02	3,5E+05
9,4E-02	8,8E-03	2,2E+03	4,9E+06	4,7E+04	2,0E+00	1,1E+09	4,2E+01	8,9E+02	9,9E+05
1,7E-01	2,8E-02	3,9E+03	1,5E+07	1,2E+05	5,2E+00	2,8E+09	1,6E+02	5,0E+03	3,8E+06
2,3E-02	5,4E-04	5,4E+02	2,9E+05	2,3E+04	9,8E-01	5,3E+08	4,1E+01	1,7E+03	9,5E+05
1,0E-01	1,1E-02	2,4E+03	6,0E+06	1,3E+05	5,4E+00	3,0E+09	2,9E+02	1,5E+04	6,7E+06
8,1E-02	6,6E-03	1,9E+03	3,6E+06	1,5E+05	6,4E+00	3,5E+09	5,0E+02	3,9E+04	1,2E+07
1,3E-01	1,8E-02	3,1E+03	9,8E+06	3,4E+05	1,5E+01	7,9E+09	1,6E+03	1,7E+05	3,7E+07
1,3E+01	7,2E+01	3,0E+05	3,8E+10	1,3E+06	5,6E+01	3,0E+10	2,7E+03	2,3E+05	6,2E+07
1,1E+00	6,0E+00	2,5E+04	3,1E+09	1,1E+05	4,6E+00	2,5E+09	2,2E+02	1,9E+04	5,2E+06

Tabela 46 – Cálculos dos resíduos e das concentrações de Pb (µg/L) dos padrões de calibração com o modelo linear de calibração pesada

Padrões	Sinal (cps)				Cálculos de concentrações (µg/L)						
	Sinal calc.	Resíduos	Res. pes.	Erro (%)	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	CV <sub>r</sub> (%)	Erro  (%)	Aceitação
P0	6,5E+02	1,7E+03	6,9E+03	7,2E+01	7,0E-02	7,6E-02		7,3E-02	6,0E+00	#DIV/0!	#DIV/0!
P1	2,6E+04	-5,4E+02	-1,2E+03	-2,2E+00	1,1E+00	1,1E+00	1,1E+00	1,1E+00	5,6E-01	2,2E+00	ACEITAR
P1,5	3,8E+04	-1,0E+03	-5,1E+03	-2,8E+00	1,6E+00	1,6E+00	1,6E+00	1,6E+00	2,6E-01	2,8E+00	ACEITAR
P2	5,0E+04	-1,3E+03	-1,8E+02	-2,8E+00	2,1E+00	2,1E+00	2,0E+00	2,1E+00	1,2E+00	2,7E+00	ACEITAR
P2,5	6,2E+04	-1,4E+03	-6,9E+02	-2,3E+00	2,6E+00	2,6E+00	2,6E+00	2,6E+00	4,9E-01	2,3E+00	ACEITAR
P10	2,5E+05	8,2E+03	9,3E+01	3,2E+00	1,1E+01	1,1E+01	1,1E+01	1,1E+01	7,4E-01	3,3E+00	ACEITAR
P20	4,9E+05	9,8E+03	4,4E+01	2,0E+00	2,1E+01	2,2E+01	2,2E+01	2,2E+01	6,2E-01	2,0E+00	ACEITAR
P30	7,2E+05	1,1E+04	6,1E+01	1,6E+00	3,2E+01	3,1E+01	3,2E+01	3,2E+01	3,8E-01	1,6E+00	ACEITAR
P40	9,6E+05	7,9E+03	4,4E+00	8,1E-01	4,2E+01	4,2E+01	4,2E+01	4,2E+01	8,9E-01	8,2E-01	ACEITAR
P50	1,2E+06	2,6E+04	5,1E+01	2,1E+00	5,3E+01	5,4E+01	5,3E+01	5,4E+01	3,7E-01	2,1E+00	ACEITAR
P80	1,8E+06	2,5E+04	2,6E+01	1,4E+00	8,0E+01		7,9E+01	8,0E+01	3,5E-01	1,4E+00	ACEITAR
P100	2,5E+06	2,2E+04	2,7E+01	8,7E-01	1,1E+02	1,1E+02	1,1E+02	1,1E+02	2,3E-01	8,8E-01	ACEITAR
Soma	8,1E+06	1,1E+05	-3,6E-11	7,4E+01	3,6E+02	2,8E+02	3,6E+02	3,6E+02	1,2E+01	#DIV/0!	#DIV/0!
Média	6,8E+05	9,0E+03	-3,0E-12	6,2E+00	3,0E+01	2,5E+01	3,2E+01	3,0E+01	1,0E+00	#DIV/0!	#DIV/0!

Tabela 47 -- Cálculos dos resíduos e das concentrações de Pb (µg/L) dos padrões de calibração com o modelo quadrático de calibração pesada

Padrões	Sinal (cps)			Cálculos de concentrações							
	Sinal calc.	Resíduos	Res. pes.	Erro (%)	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	s/x (%)	Erro  (%)	Aceitação
P0	1,2E+03	1,1E+03	4,4E+03	4,6E+01	4,5E-02	5,1E-02		4,8E-02	9,4E+00	#DIV/0!	#DIV/0!
P1	2,6E+04	-5,0E+02	-1,1E+03	-2,0E+00	1,1E+00	1,1E+00	1,1E+00	1,1E+00	5,7E-01	2,1E+00	ACEITAR
P1,5	3,7E+04	-6,7E+02	-3,4E+03	-1,8E+00	1,6E+00	1,6E+00	1,6E+00	1,6E+00	2,6E-01	1,9E+00	ACEITAR
P2	4,9E+04	-7,1E+02	-9,5E+01	-1,5E+00	2,1E+00	2,1E+00	2,1E+00	2,1E+00	1,2E+00	1,5E+00	ACEITAR
P2,5	6,1E+04	-4,4E+02	-2,2E+02	-7,3E-01	2,6E+00	2,6E+00	2,6E+00	2,6E+00	4,9E-01	7,4E-01	ACEITAR
P10	2,5E+05	1,3E+04	1,5E+02	5,0E+00	1,1E+01	1,1E+01	1,2E+01	1,2E+01	7,4E-01	5,3E+00	ACEITAR
P20	4,8E+05	1,8E+04	7,8E+01	3,5E+00	2,2E+01	2,2E+01	2,2E+01	2,2E+01	6,1E-01	3,6E+00	ACEITAR
P30	7,1E+05	2,0E+04	1,1E+02	2,8E+00	3,2E+01	3,2E+01	3,2E+01	3,2E+01	3,8E-01	2,8E+00	ACEITAR
P40	9,6E+05	1,6E+04	8,7E+00	1,6E+00	4,2E+01	4,3E+01	4,3E+01	4,2E+01	8,8E-01	1,6E+00	ACEITAR
P50	1,2E+06	3,0E+04	6,0E+01	2,4E+00	5,4E+01	5,4E+01	5,4E+01	5,4E+01	3,7E-01	2,4E+00	ACEITAR
P80	1,8E+06	1,2E+04	1,2E+01	6,6E-01	7,9E+01		7,9E+01	7,9E+01	3,4E-01	6,4E-01	ACEITAR
P100	2,5E+06	-2,7E+04	-3,4E+01	-1,1E+00	1,1E+02	1,1E+02	1,1E+02	1,1E+02	2,2E-01	1,0E+00	ACEITAR
Soma	8,1E+06	8,0E+04	-5,9E-11	5,5E+01	3,2E+02	2,6E+02	3,2E+02	3,6E+02	1,5E+01	#DIV/0!	#DIV/0!
Média	6,8E+05	6,6E+03	-4,9E-12	4,6E+00	3,0E+01	2,3E+01	3,0E+01	3,0E+01	1,3E+00	#DIV/0!	#DIV/0!

Tabela 48 – Cálculos das somas dos quadrados e dos quadrados médios para aplicação da “ANOVA pesada” ao modelo linear pesado de calibração

Padrões	$S_{w,total}$				$S_{w,Res}$			$S_{w,PE}$				$S_{w,FA}$	$S_{w,REG}$
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	$\Sigma$	Leitura 1	Leitura 3	$\Sigma$	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	$\Sigma$		
P0	1,9E+12	1,9E+12		3,8E+12	1,1E+07		2,3E+07	2,1E+04	2,1E+04		4,2E+04	2,3E+07	3,8E+12
P1	9,8E+11	9,8E+11	9,8E+11	2,9E+12	3,8E+05	1,1E+06	2,1E+06	4,0E+04	1,3E+02	4,4E+04	8,4E+04	2,0E+06	2,9E+12
P1,5	2,1E+12	2,1E+12	2,1E+12	6,3E+12	6,2E+06	4,4E+06	1,6E+07	5,2E+04	3,8E+03	2,8E+04	8,4E+04	1,5E+07	6,3E+12
P2	5,4E+10	5,4E+10	5,5E+10	1,6E+11	1,6E+05	5,3E+05	8,2E+05	9,1E+03	2,0E+04	5,5E+04	8,4E+04	7,4E+05	1,6E+11
P2,5	1,9E+11	2,0E+11	1,9E+11	5,8E+11	7,7E+05	6,9E+05	2,9E+06	8,6E+03	5,5E+04	2,0E+04	8,4E+04	2,8E+06	5,8E+11
P10	2,0E+09	2,0E+09	2,0E+09	6,1E+09	5,5E+05	1,2E+06	2,4E+06	1,9E+04	9,7E+03	5,5E+04	8,4E+04	2,3E+06	6,3E+09
P20	1,6E+08	1,5E+08	1,5E+08	4,6E+08	1,8E+05	6,9E+05	1,4E+06	5,0E+04	2,4E+03	3,1E+04	8,4E+04	1,3E+06	5,1E+08
P30	1,1E+07	8,6E+06	9,6E+06	2,9E+07	1,1E+06	6,5E+05	2,1E+06	4,6E+04	3,8E+04	3,9E+02	8,4E+04	2,1E+06	1,6E+07
P40	4,3E+07	4,7E+07	4,7E+07	1,4E+08	2,5E+03	9,2E+04	1,9E+05	5,6E+04	1,4E+04	1,4E+04	8,4E+04	1,0E+05	1,3E+08
P50	5,9E+08	6,1E+08	5,9E+08	1,8E+09	1,1E+06	1,1E+06	4,0E+06	1,4E+04	5,6E+04	1,4E+04	8,4E+04	3,9E+06	1,6E+09
P80	1,4E+09		1,4E+09	2,7E+09	9,1E+05	4,4E+05	1,3E+06	2,1E+04		2,1E+04	4,2E+04	1,3E+06	2,6E+09
P100	4,1E+09	4,2E+09	4,2E+09	1,3E+10	3,0E+05	6,8E+05	1,9E+06	5,1E+04	3,0E+04	2,9E+03	8,4E+04	1,8E+06	1,2E+10
Soma	5,2E+12	5,2E+12	3,3E+12	1,4E+13	2,2E+07	1,2E+07	5,8E+07	3,9E+05	2,5E+05	2,9E+05	9,2E+05	5,7E+07	1,4E+13
Média	4,4E+11	4,4E+11	2,8E+11	1,1E+12	1,9E+06	9,6E+05	4,8E+06	3,2E+04	2,1E+04	2,4E+04	7,7E+04	4,7E+06	1,1E+12

**Tabela 49 – Cálculos das somas dos quadrados e dos quadrados médios necessários à aplicação da “ANOVA pesada” ao modelo linear pesado de calibração**

Padrões	$S_{w,Res}$				$S_{w,FA}$	$S_{w,REG}$
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	$\Sigma$		
<b>P0</b>	4,2E+06	5,4E+06		9,6E+06	1,4E+07	5,7E+12
<b>P1</b>	3,0E+05	5,5E+05	9,2E+05	1,8E+06	1,7E+06	2,9E+12
<b>P1,5</b>	3,0E+06	2,1E+06	1,8E+06	6,8E+06	6,8E+06	6,3E+12
<b>P2</b>	2,7E+04	1,4E+04	2,4E+05	2,8E+05	2,0E+05	1,6E+11
<b>P2,5</b>	4,8E+04	3,0E+05	2,9E+04	3,8E+05	2,9E+05	5,8E+11
<b>P10</b>	1,6E+06	1,7E+06	2,6E+06	5,9E+06	5,8E+06	6,5E+09
<b>P20</b>	9,0E+05	1,5E+06	1,8E+06	4,2E+06	4,1E+06	5,6E+08
<b>P30</b>	2,8E+06	1,6E+06	2,1E+06	6,6E+06	6,5E+06	8,2E+06
<b>P40</b>	1,7E+04	2,4E+05	2,3E+05	4,9E+05	4,0E+05	1,2E+08
<b>P50</b>	1,5E+06	2,5E+06	1,5E+06	5,5E+06	5,4E+06	1,6E+09
<b>P80</b>	2,8E+05		5,9E+04	3,4E+05	4,5E+05	4,0E+09
<b>P100</b>	1,4E+06	6,3E+05	8,3E+05	2,9E+06	2,8E+06	1,3E+10
<b>Soma</b>	1,6E+07	1,7E+07	1,2E+07	<b>4,5E+07</b>	<b>4,9E+07</b>	<b>1,6E+13</b>
<b>Média</b>	1,3E+06	1,4E+06	1,0E+06	3,7E+06	4,1E+06	1,3E+12



### 7.1.2. Validação da análise de Cu em cabelo por ICP-MS

- Seletividade (ensaios de recuperação)

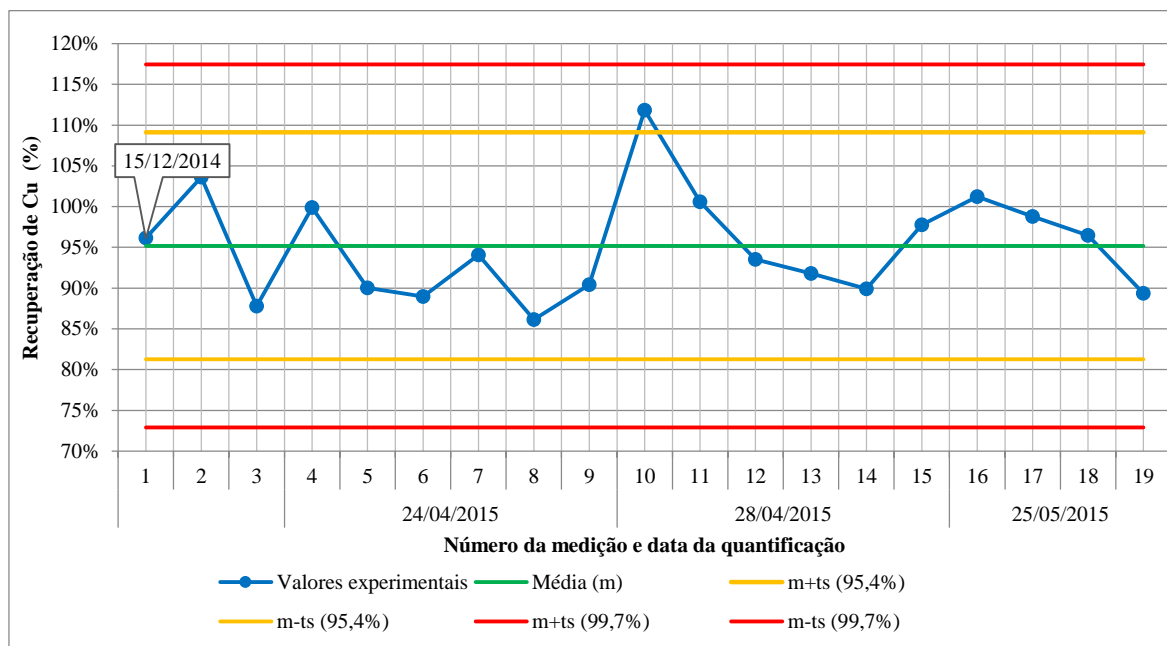


Figura 77 – Carta de controle das recuperações obtidas na análise de Cu por ICP-MS em soluções de cabelo digerido reforçadas com esse elemento

- Quantificação

Tabela 50 – Parâmetros das funções de calibração válidas obtidas na análise de Cu por ICP-MS

Dia de análise	Bloco de calibração	Parâmetros das funções de calibração			
		$m_w$ (cps·L/μg)	$b_w$ (cps)	$b_w$ (μg/L)	$r$
28/11/2014	1	705	748	1,1E+00	0,999837
15/12/2014	1	1079	847	7,9E-01	0,999998
05/02/2015	1.1	873	2801	3,2E+00	0,999999
	1.2	846	1040	1,2E+00	0,999997
20/02/2015	1	704	927	1,3E+00	0,999936
02/03/2015	1	1153	1290	1,1E+00	0,999782
11/03/2015	1	1119	763	6,8E-01	0,999986
18/03/2015	1.1	817	503	6,2E-01	0,999761
	1.2	639	420	6,6E-01	0,999928
19/03/2015	1.1	614	545	8,9E-01	0,999992
	1.2	671	492	7,3E-01	0,999914
10/04/2015	1.1	1019	255	2,5E-01	0,999909
	2.1	633	91	1,4E-01	0,999796
	2.2	480	79	1,6E-01	0,999998
24/04/2015	1	296	46	1,6E-01	0,999844
28/04/2015	1	670	97	1,4E-01	0,999953
25/05/2015	1	1212	2863	2,4E+00	0,999832
03/06/2015	1	1404	1041	7,4E-01	0,999972
Mínimo		296	46	1,4E-01	0,999761
Máximo		1404	2863	2,4E+00	0,999999
(Média)		769	585	6,2E-01	0,999913
(s)		324	811	6,4E-01	0,000081

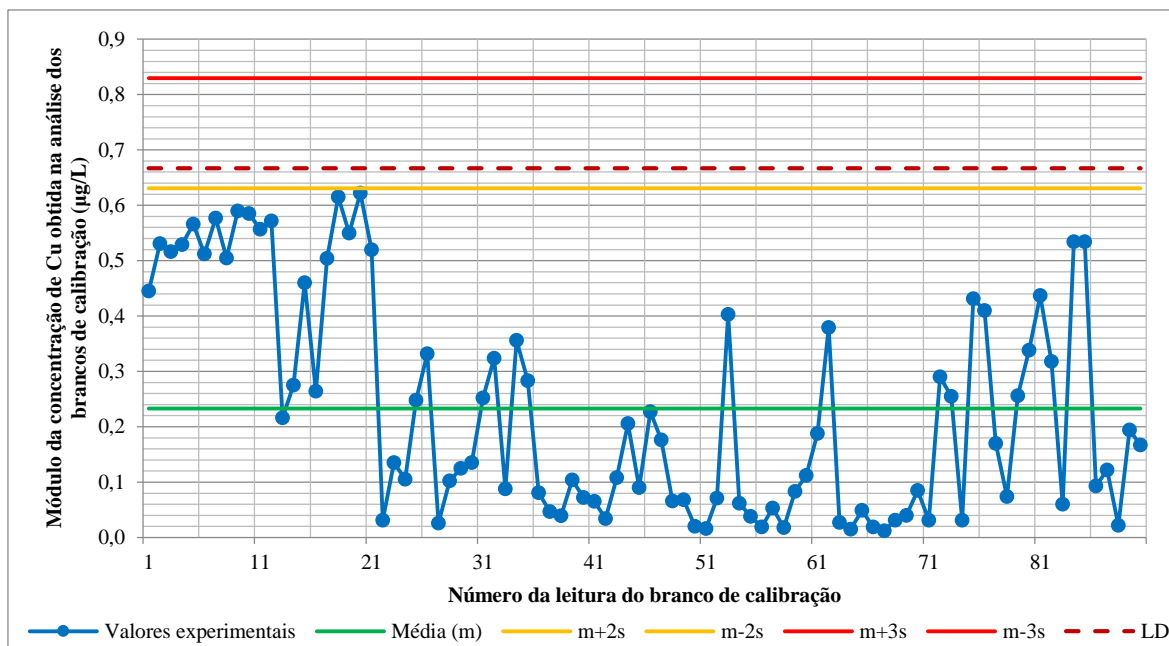


Figura 78 – Carta de controle dos valores absolutos das concentrações de Cu obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de calibração

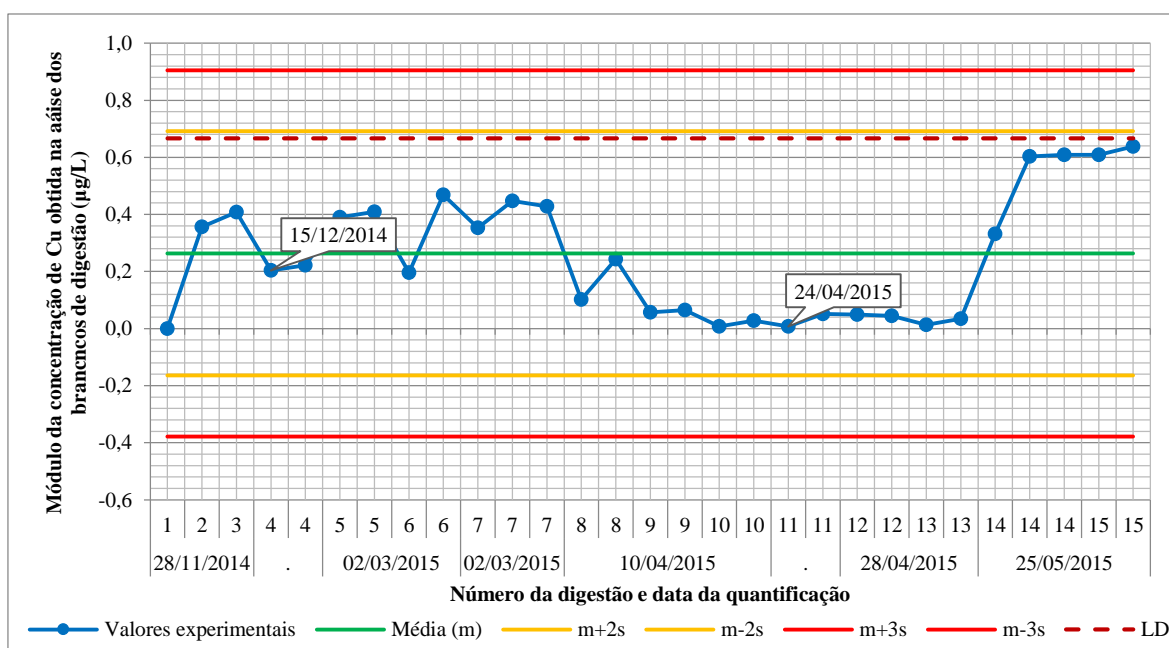
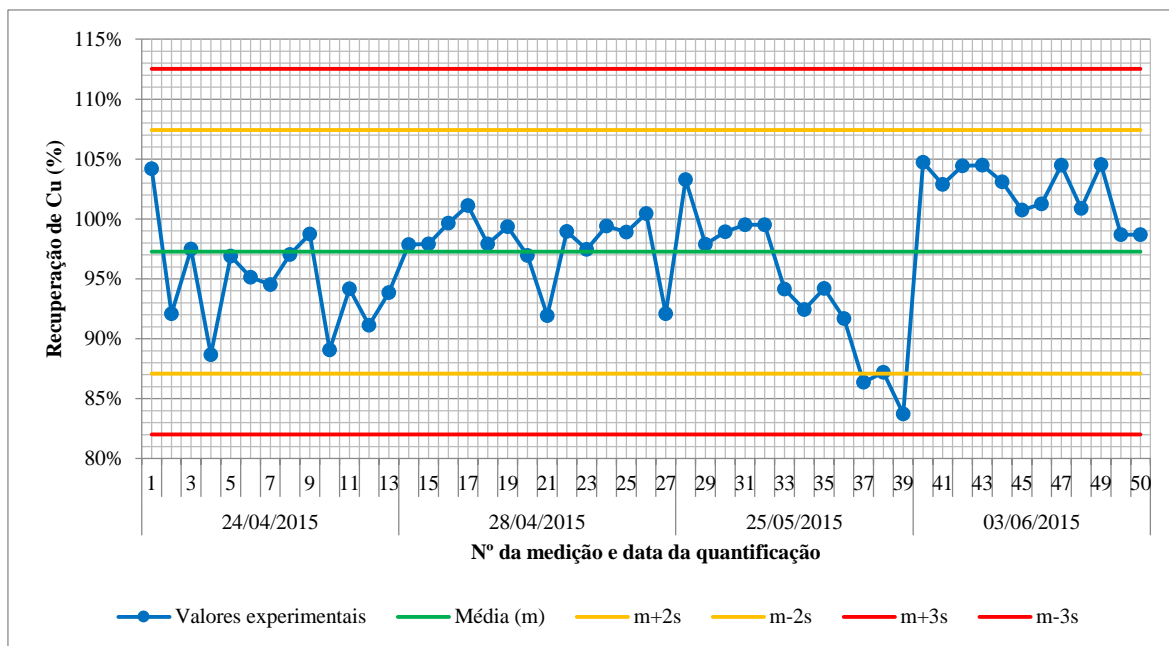


Figura 79 – Carta de controle dos valores absolutos das concentrações de Cu obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de digestão



**Figura 80 – Carta de controlo para a recuperação de Cu (relativamente à concentração de referência de  $\approx 2 \mu\text{g/L}$ ) na análise por ICP-MS do PVLQ**

- Precisão
- Repetibilidade

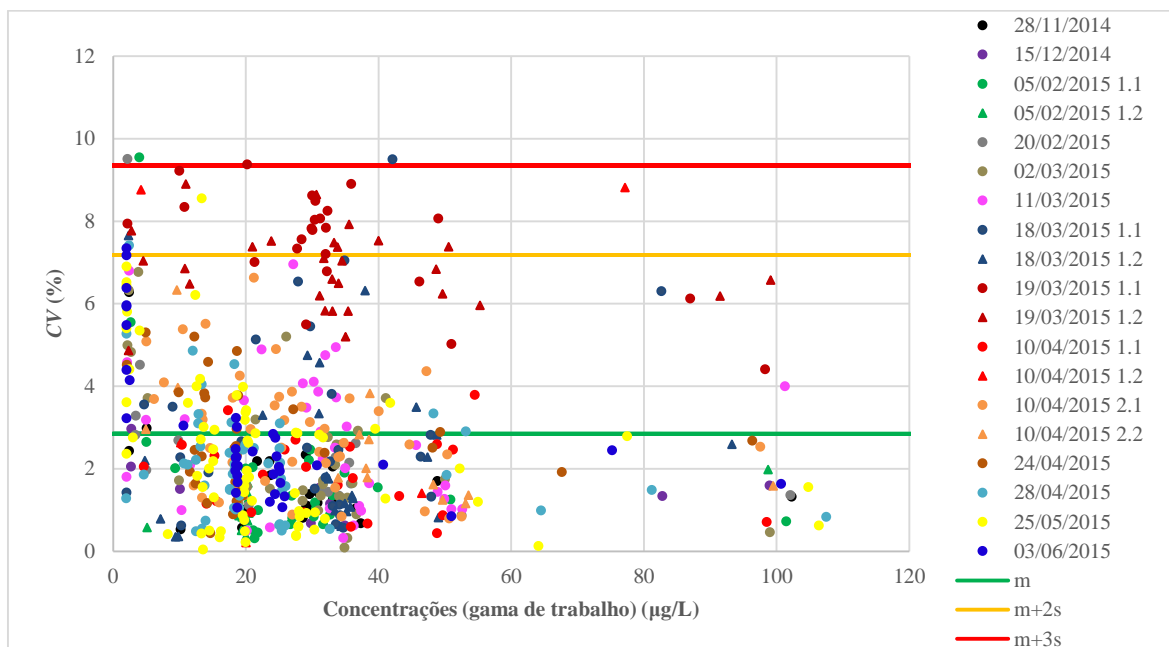


Figura 81 – Coeficiente variação (desvio-padrão relativo) obtido nas três réplicas de leitura realizadas na análise de Cu por ICP-MS

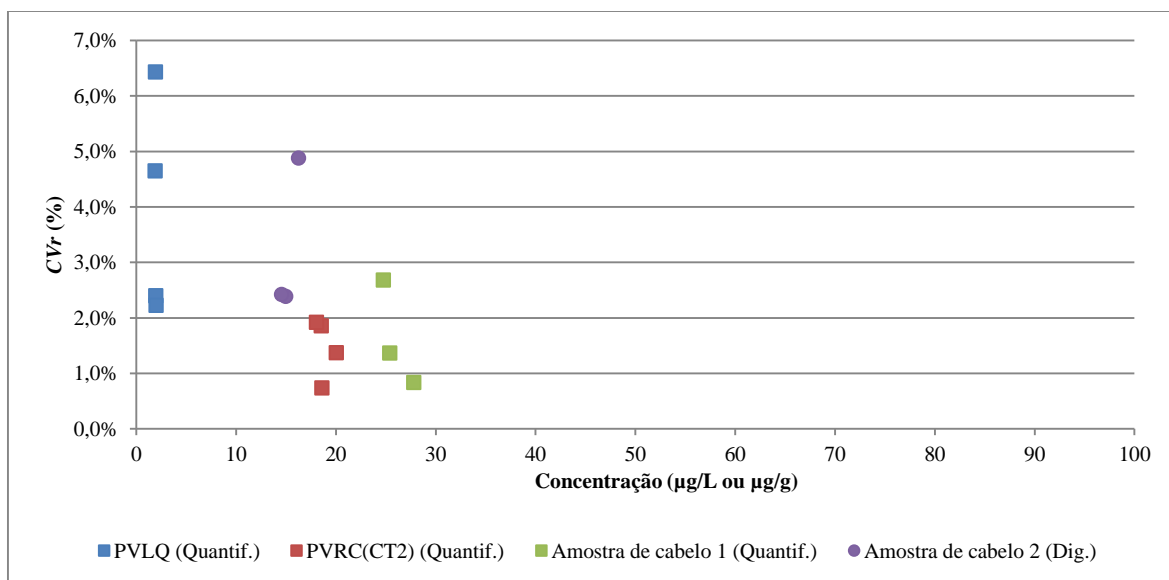


Figura 82 – Coeficientes de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) associados à quantificação de Cu por ICP-MS em várias soluções. “Quantif.”: Desvio-padrão relativo de 10 réplicas de leitura da concentração (µg/L) de Pb numa mesma solução aspirada repetidamente (aspirações da solução de teste intercaladas com aspiração da solução de lavagem); “Dig.”: Desvio-padrão relativo da leitura da concentração (µg/g) de 10 réplicas de digestão (aspiração sucessivas de soluções de várias porções de uma amostra de cabelo digerido num único ciclo de digestão)

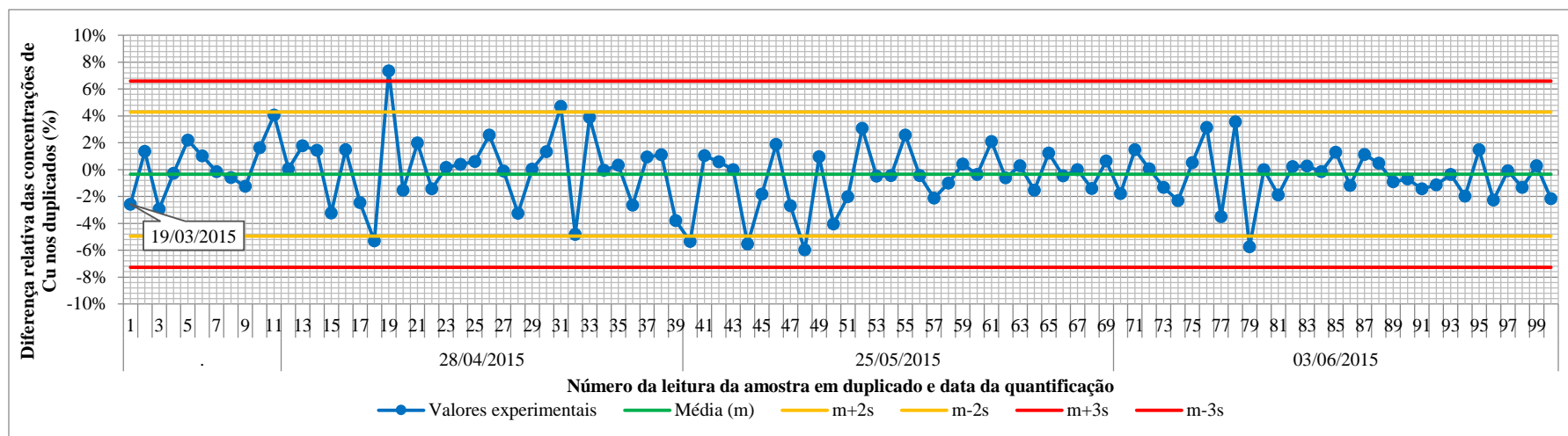


Figura 83 – Carta de controle para a diferença relativa entre duplicados de leitura da concentração de Cu obtida na análise por ICP-MS, em condições de repetibilidade (leituras consecutivas da mesma solução, intercaladas por aspiração da solução de lavagem do equipamento)

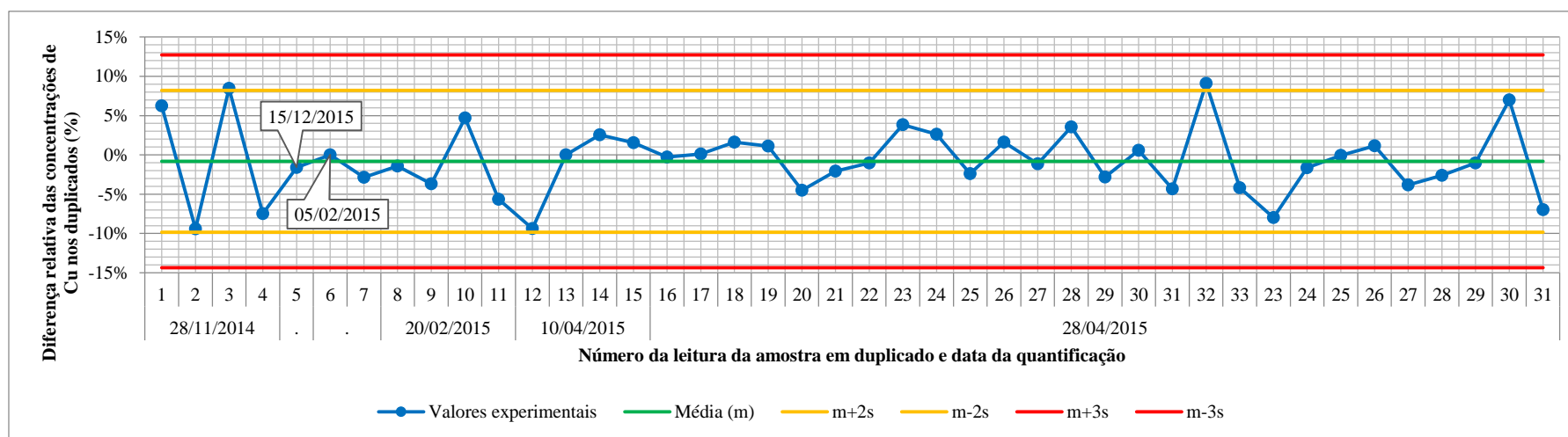


Figura 84 – Carta de controle para a diferença relativa entre as concentrações de Cu obtidas na análise por ICP-MS de duplicados de digestão, em condições de repetibilidade

- **Justeza**

- **Análise dos MRC de cabelo**

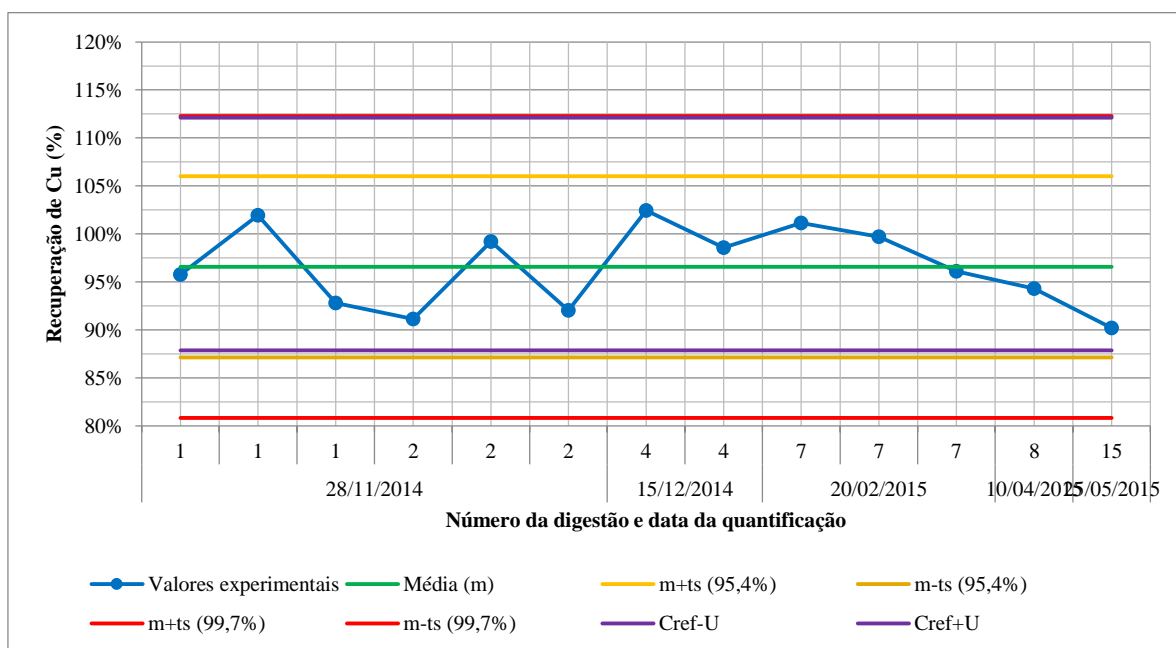


Figura 85 – Carta de controle da recuperação de Cu obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM DB001

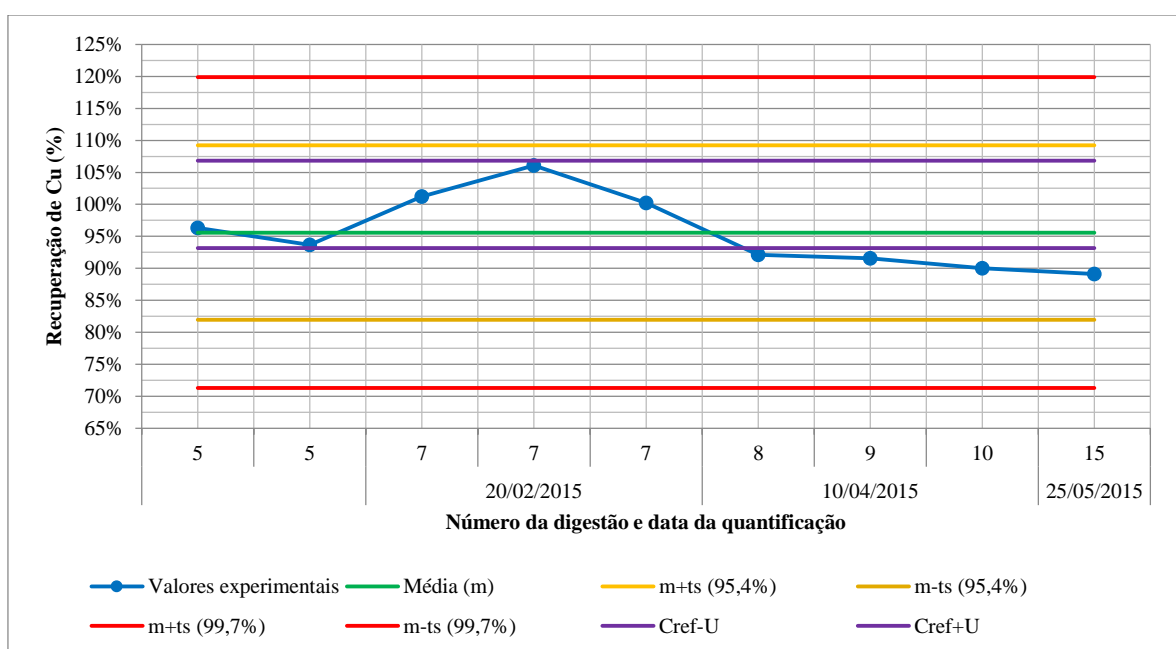
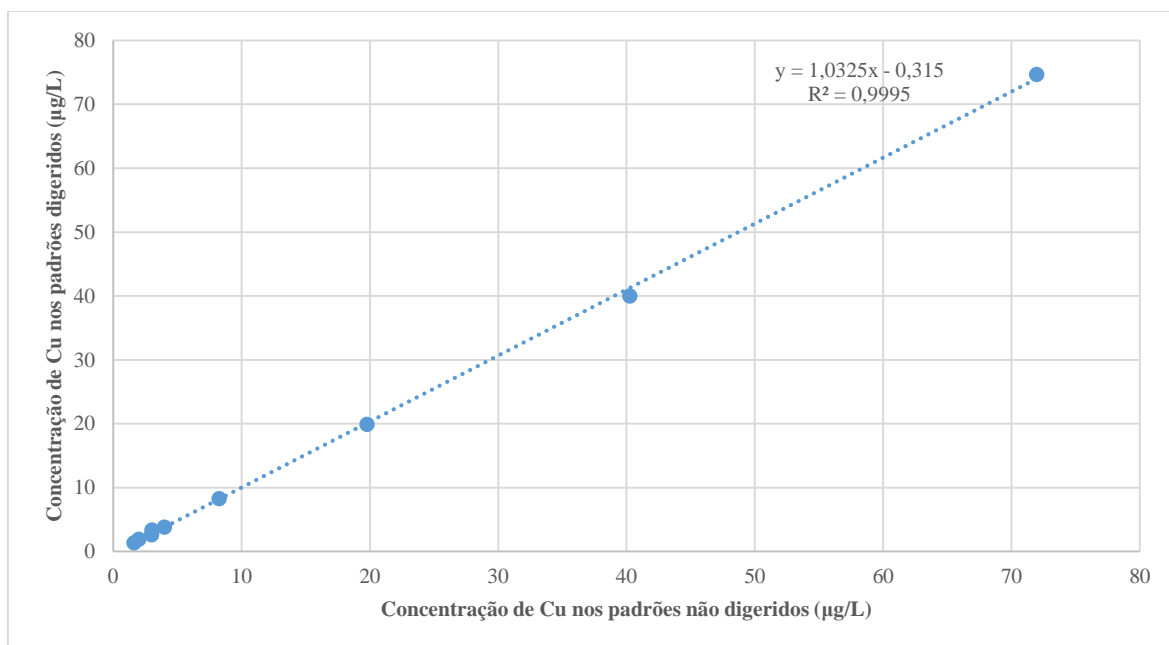


Figura 86 – Carta de controle da recuperação de Cu obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM GBW09101

○ Digestão de padrões



**Figura 87 – Comparação das concentrações de Cu (µg/L) obtidas na análise por ICP-MS dos dois conjuntos de padrões aquosos preparados para avaliação do erro de justeza da digestão**

### 7.1.3. Validação da análise de Zn em cabelo por ICP-MS

- Seletividade (ensaios de recuperação)

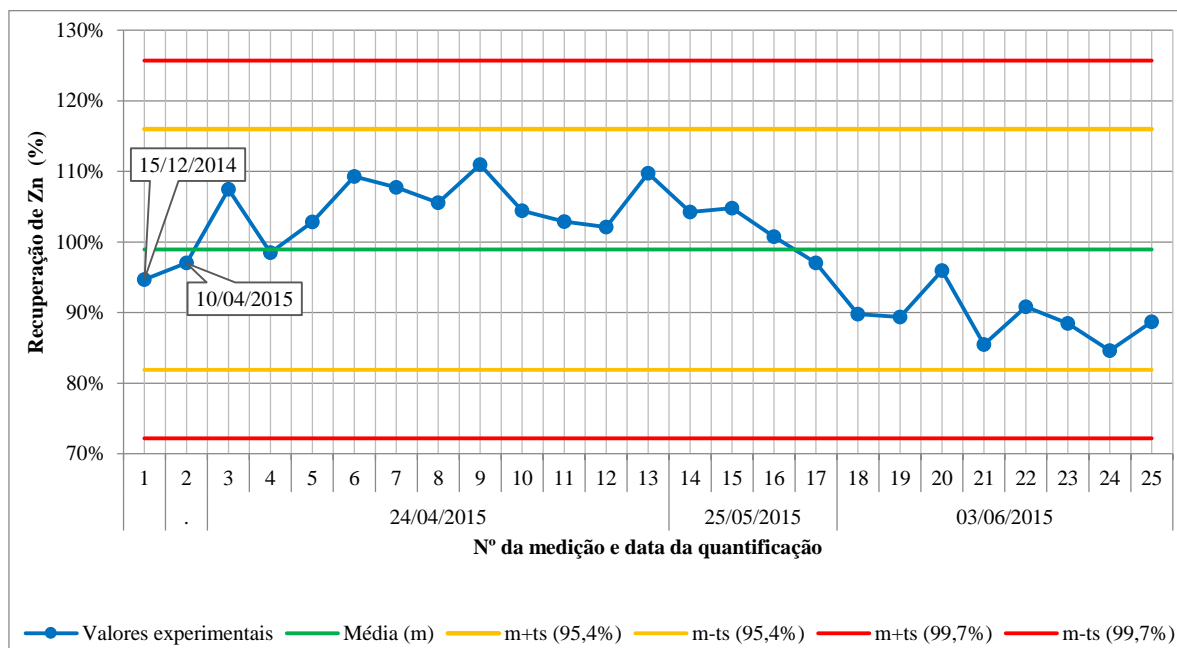


Figura 88 – Carta de controle das recuperações obtidas na análise de Zn por ICP-MS em soluções de cabelo digerido reforçadas com esse elemento

- Quantificação

Tabela 51 – Parâmetros das funções de calibração válidas obtidas na análise de Zn por ICP-MS

Dia de análise	Bloco de calibração	Parâmetros das funções de calibração			
		$m_w$ (cps·L/μg)	$b_w$ (cps)	$b_w$ (μg/L)	$r$
28/11/2014	1	669	979	1,5E+00	0,999955
15/12/2014	1	861	1387	1,6E+00	0,999992
05/02/2015	1.1	734	973	1,3E+00	0,999986
	1.2	714	564	7,9E-01	1,000000
20/02/2015	1	624	11189	1,8E+01	0,999955
02/03/2015	1	926	2999	3,2E+00	0,999683
11/03/2015	1	901	4930	5,5E+00	0,999994
18/03/2015	1.1	698	1146	1,6E+00	0,999784
	1.2	565	1019	1,8E+00	0,999951
19/03/2015	1.1	532	554	1,0E+00	0,999982
	1.2	559	612	1,1E+00	0,999944
10/04/2015	1.1	847	1435	1,7E+00	0,999937
	2.1	572	979	1,7E+00	0,999867
	2.2	436	755	1,7E+00	0,999976
24/04/2015	1	244	177	7,3E-01	0,999798
28/04/2015	1	591	260	4,4E-01	0,999442
25/05/2015	1	844	1060	1,3E+00	0,999938
03/06/2015	1	980	1023	1,0E+00	0,999976
Mínimo		244	177	4,4E-01	0,999442
Máximo		980	1435	1,8E+00	1,000000
(Média)		624	820	1,3E+00	0,999898
(s)		207	386	4,6E-01	0,000159



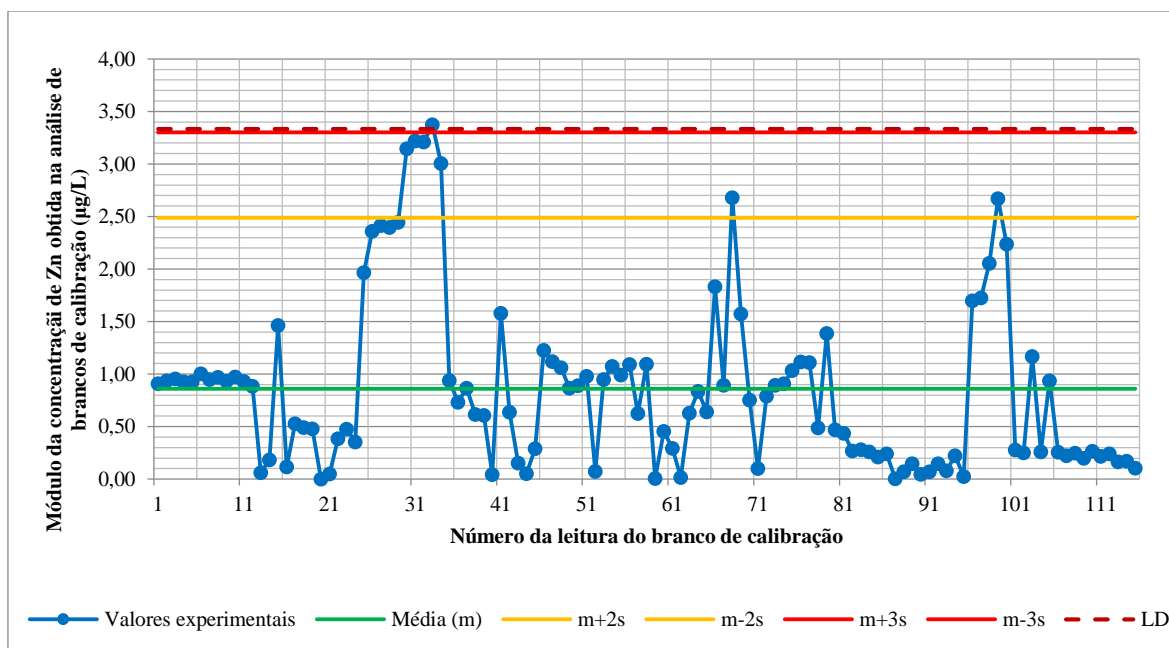


Figura 89 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Zn obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de calibração

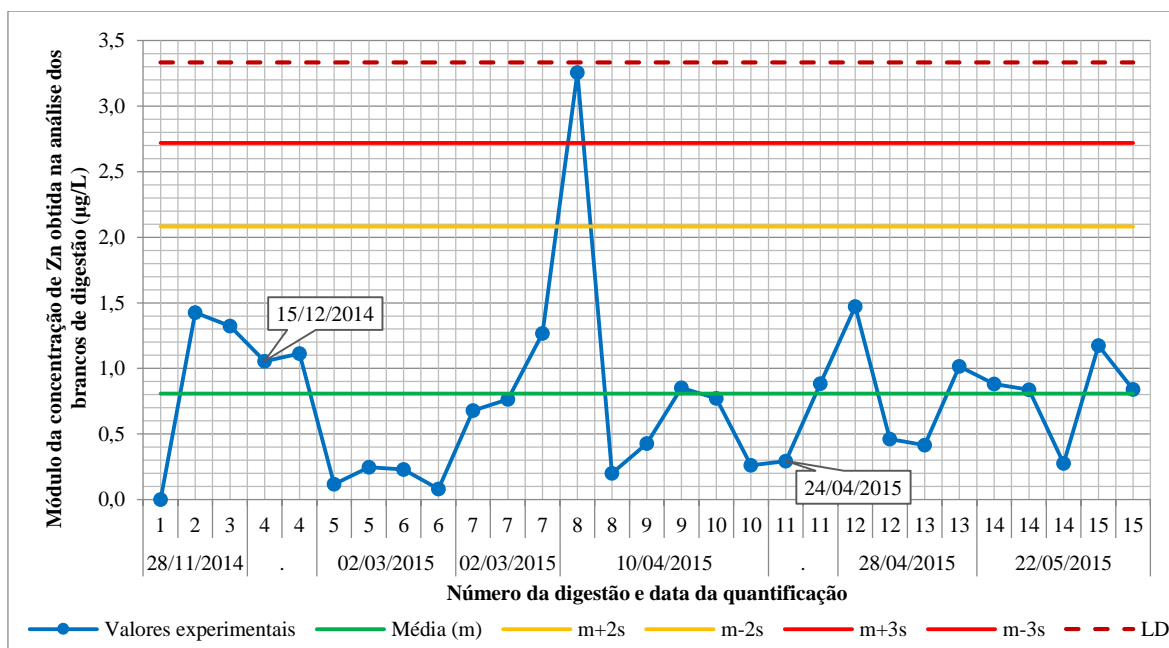


Figura 90 – Carta de controlo dos valores absolutos das concentrações de Zn obtidas na análise por ICP-MS dos brancos de digestão

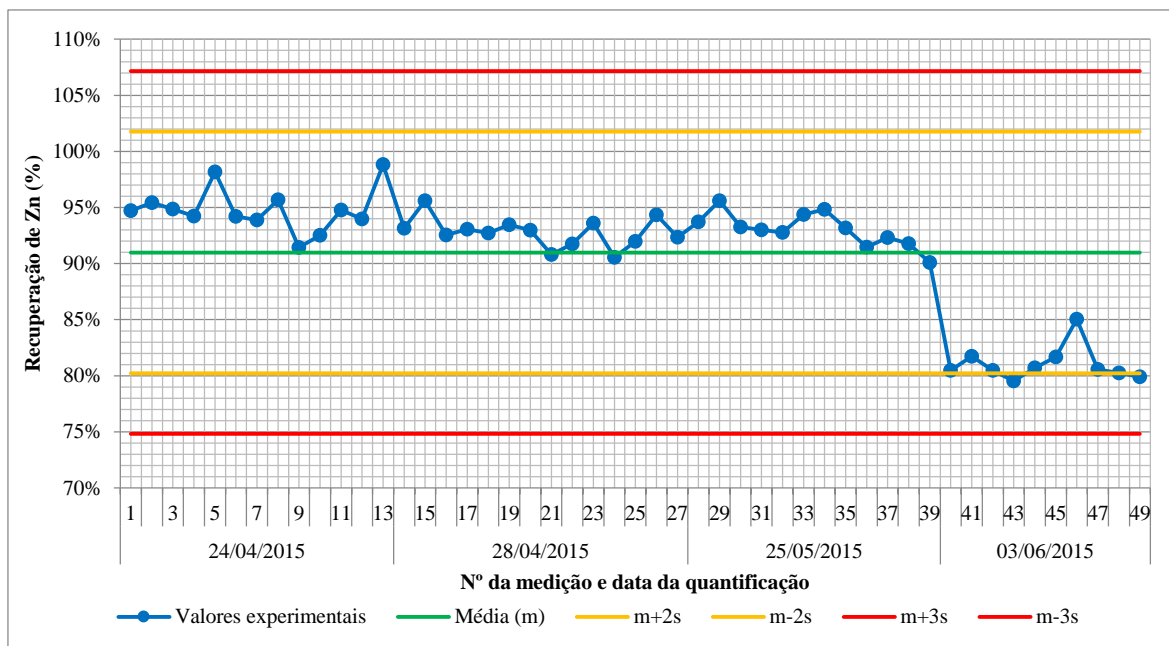


Figura 91 – Carta de controle para a recuperação de Zn (relativamente à concentração de referência de  $\approx 10 \mu\text{g/L}$ ) na análise por ICP-MS do PVLQ

- Precisão
- Repetibilidade

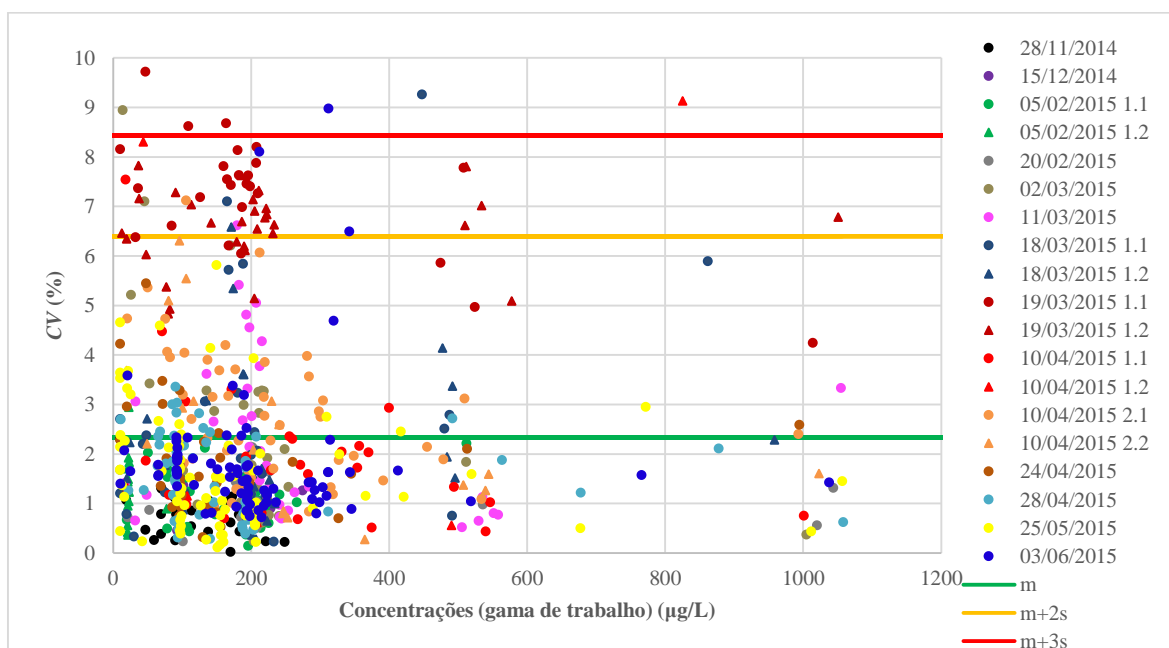
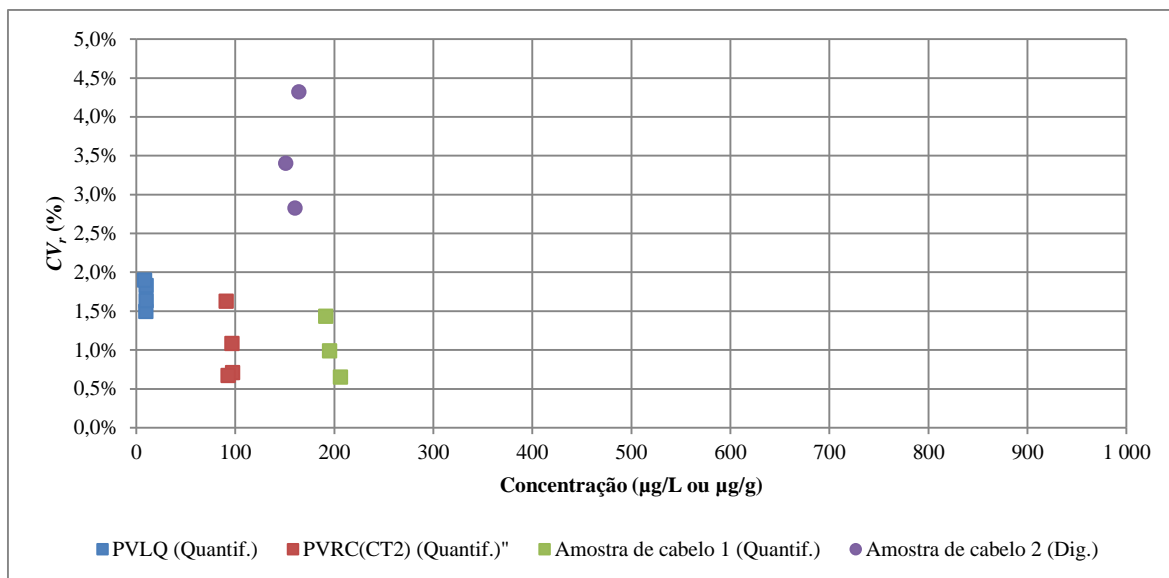


Figura 92 – Coeficiente variação (desvio-padrão relativo) obtido nas três réplicas de leitura realizadas na análise de Zn por ICP-MS



**Figura 93 – Coeficientes de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) associados à quantificação de Zn por ICP-MS em várias soluções. “Quantif.”: Desvio-padrão relativo de 10 réplicas de leitura da concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) de Pb numa mesma solução aspirada repetidamente (aspirações da solução de teste intercaladas com aspiração da solução de lavagem); “Dig.”: Desvio-padrão relativo da leitura da concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) de 10 réplicas de digestão (aspiração sucessivas de soluções de várias porções de uma amostra de cabelo digerido num único ciclo de digestão)**

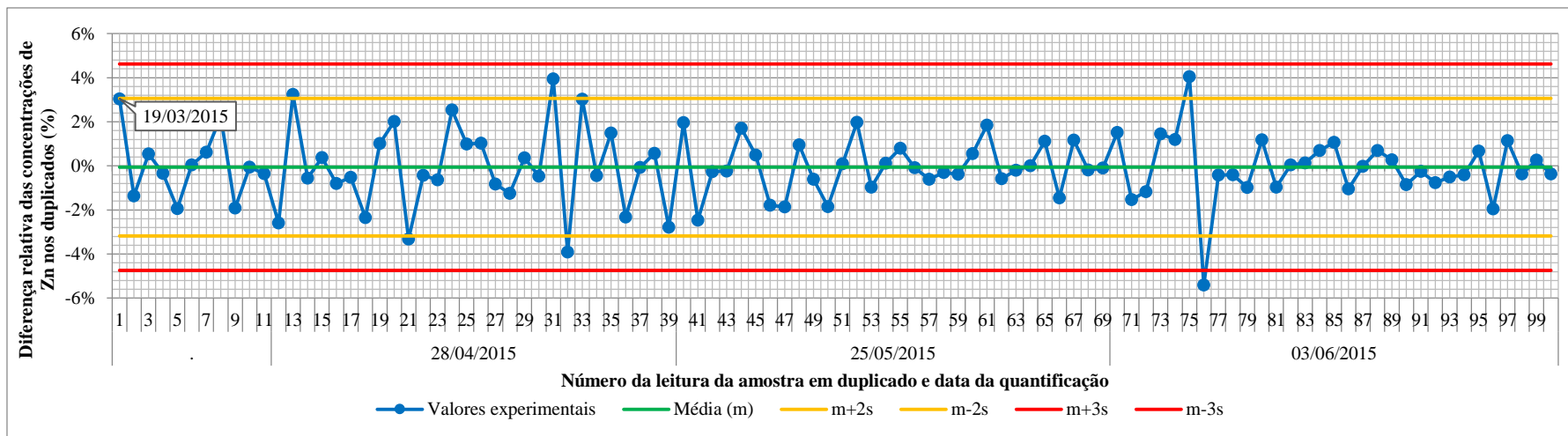


Figura 94 – Carta de controle da diferença relativa entre duplicados de leitura da concentração de Zn obtida na análise por ICP-MS, em condições de repetibilidade (leituras consecutivas da mesma solução, intercaladas por aspiração da solução de lavagem do equipamento)

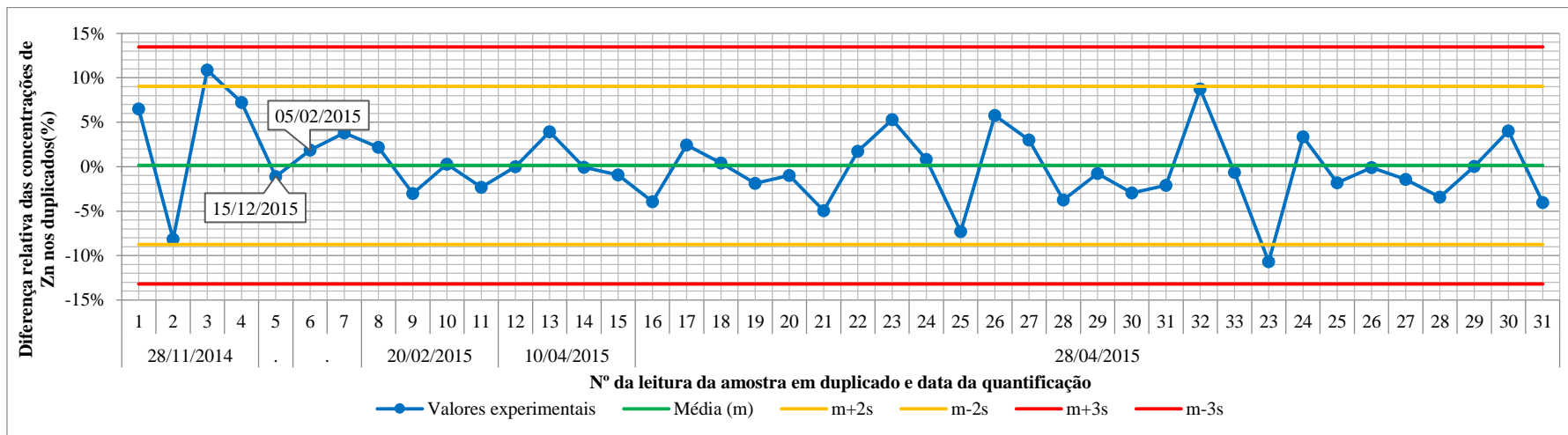


Figura 95 – Carta de controle da diferença relativa entre as concentrações de Zn obtidas na análise por ICP-MS de duplicados de digestão, em condições de repetibilidade

- **Justeza**

- **Análise dos MRC de cabelo**

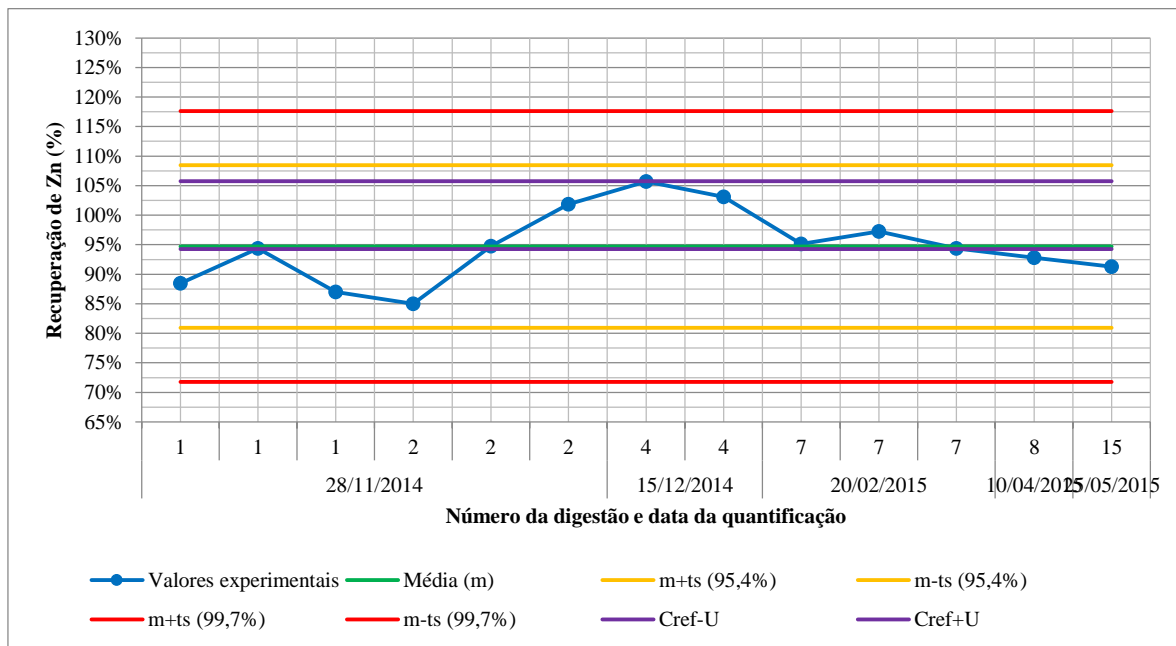


Figura 96 – Carta de controle da recuperação de Zn obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC ERM DB001

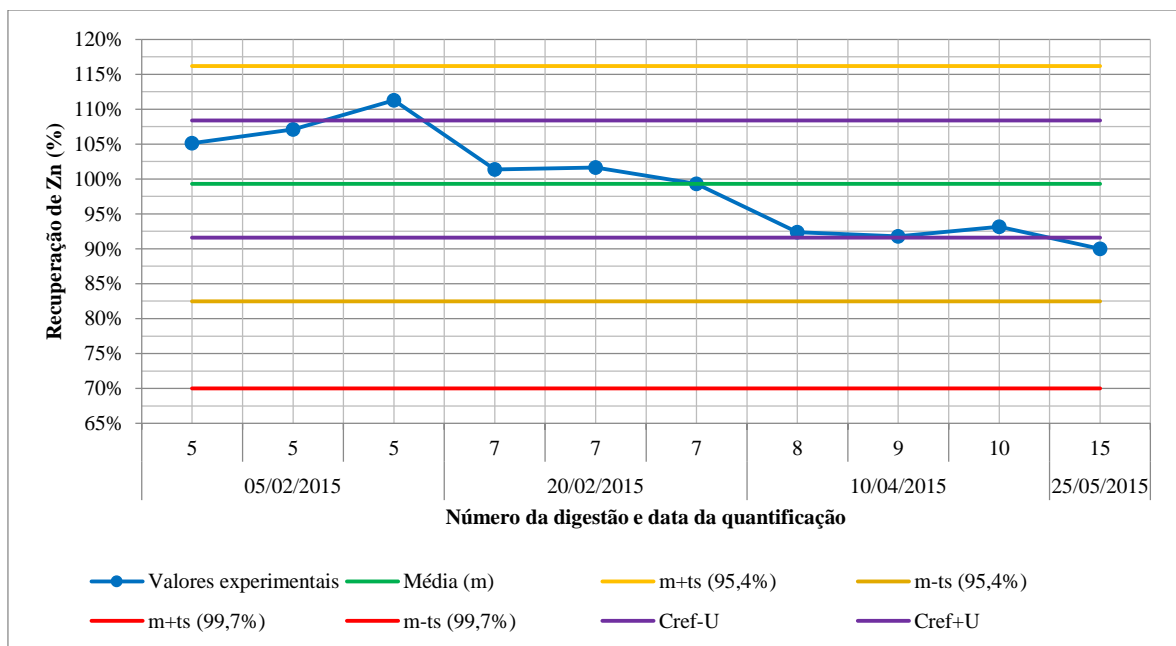


Figura 97 – Carta de controle da recuperação de Zn obtida na primeira análise válida por ICP-MS do MRC GBW 09101b

○ Digestão de padrões

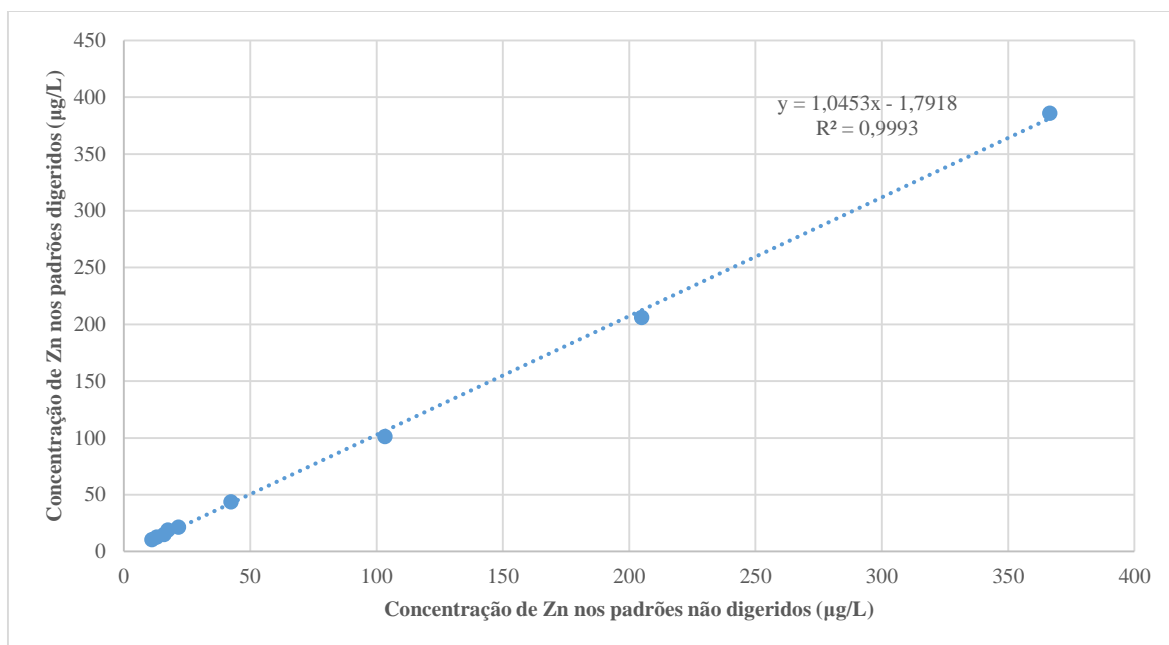


Figura 98 – Comparação das concentrações de Zn (µg/L) obtidas na análise por ICP-MS dos dois conjuntos de padrões aquosos preparados para avaliação do erro de justeza da digestão

